

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALMIR BAPTISTA DA SILVA

CATÁLISE COM DERIVADOS DE IMIDAZOL EM REAÇÕES COM
ORGANOFOSFORADOS: EFEITO DO SUBSTITUINTE

CURITIBA

2017

VALMIR BAPTISTA DA SILVA

CATÁLISE COM DERIVADOS DE IMIDAZOL EM REAÇÕES COM
ORGANOFOSFORADOS: EFEITO DO SUBSTITUINTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso de
Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências
Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisa Souza Orth
Coorientador: Prof. Dr. Alfredo R. Marques de Oliveira

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S586c Silva, Valmir Baptista da

Catálise com derivados de imidazol em reações com organofosforados: efeito do substituinte [recurso eletrônico] / Valmir Baptista da Silva, 2017.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Orth

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo R. Marques de Oliveira

1. Cinética química. 2. Cinética de enzimas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Orth, Elisa Souza. III. Oliveira, Alfredo R. Marques de. III. Título.

CDD 541.394

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563

TERMO DE APROVAÇÃO

**CATÁLISE COM DERIVADOS DE IMIDAZOL EM REAÇÕES COM
ORGANOFOSFORADOS: EFEITO DO SUBSTITUINTE**

por

VALMIR BAPTISTA DA SILVA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof.ª Dr.ª Elisa Souza Orth
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Fernando de Carvalho da Silva
Instituto de Química – UFF



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 28 de julho de 2017.

Dedicado aos fascinados pela
química do imidazol.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a Elisa Orth que me orienta desde os tempos de iniciação científica, que até hoje se mostrou uma pessoa extremamente acessível, que contribuiu fortemente com minha formação acadêmica e despertou em mim a paixão por “problemas cinéticos” e como a cinética pode servir para resolver questões da química orgânica. Além disso sou grato por acreditar no meu potencial acadêmico, por ter sido compreensiva em diversos momentos e “puxar a orelha” quando necessário.

Agradeço ao “titio” Prof. Alfredo de Oliveira por ter aberto as portas do seu laboratório de síntese orgânica, fornecendo condições de trabalho para que as sínteses aqui descritas pudessem ser desenvolvidas. Agradeço ainda por ter se mostrado sempre disponível para discutir os problemas químicos enfrentados, demonstrando ser uma pessoa de grande conhecimento teórico e experimental na arte da química.

Agradeço aos colegas de laboratório dos grupos de pesquisa GCC, GPMIn, GQM e Lasque que conviveram comigo e compartilharam das alegrias e tristezas acontecidas durante essa etapa da pós-graduação. Do GCC, em especial ao Sirlon que é meu camarada desde os tempos da graduação e esteve comigo durante mais essa jornada. Ao Renan que colaborou com a minha entrada no mundo da físico-química orgânica, pelas discussões e parceria. Ao Eletron que colaborou com os trabalhos experimentais na reta final desse trabalho. Ao Thomas que desenvolveu parte do trabalho com hidroxiimidazóis em seu projeto de estágio e sempre teve um tempo para agradáveis discussões entre um “ciga” e outro. Devo agradecer também aos amigos do Lasque Rodolfo, Kelvin e Bruno, que foram parceiros nas longas noites (e finais de semana) de trabalho e que sempre se mostraram dispostos a discutir síntese de compostos derivados de imidazol e química em geral. Agradeço a Juliana pela ajuda experimental e pelas discussões sobretudo na primeira metade do desenvolvimento desse trabalho. Agradeço ao Rafael “Nou” pela parceria e amizade ao longo desse tempo, uma pessoa que sempre tinha uma boa história para contar.

Agradeço ao Laboratório de Semioquímicos coordenado pelo Prof. Paulo Zarbin por permitir a utilização do equipamento de cromatografia a gás, sendo esse apoio muito importante nas etapas iniciais desse trabalho. Agradeço ao Leociley e a

Maria, do centro de RMN, por sempre estarem dispostos a colaborar com análises e utilização dos equipamentos de RMN.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química que são a minha segunda casa há pelo menos 7 anos. Agradeço aos professores, técnicos e demais trabalhadores que mantêm essa estrutura funcionando e são fundamentais para a sociedade.

Agradeço aos Prof. Leandro Piovan pelas correções do projeto de mestrado e as contribuições feitas no primeiro relatório anual. Agradeço ao Prof. Claudiney Cordeiro e Prof. Fábio Nunes pelas contribuições no exame de qualificação.

Agradeço ao Prof. Dr Paulo H. G. Zarbin e Prof. Dr Fernando de Carvalho pelo aceite em avaliar esse trabalho.

Agradeço aos meus pais e minha família por todo o suporte dado em toda minha vida acadêmica e por sempre terem respeitado minhas decisões durante todos esses anos. Ao meu pai por ter me dado valiosas lições de eletrônica, que foram muito úteis, e por seus sábios dizeres.

Agradeço a todos aqueles que por um lapso de memória não estão aqui citados, mas de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida e aos órgãos de fomento que financiam a pesquisa científica no Brasil.

“There are two reasons I became inspired by open access. The first one is practical, because I myself did not have access to research papers I need. And the second is more philosophical. I like the idea of communism, and the idea that knowledge should be common and not intellectual property is very relevant. That is especially true for information.

Research articles are used for communication in science. But the word "communication" implies common ownership by itself.”

Alexandra Elbakyan, criadora do repositório Sci-Hub especializado em distribuir artigos científicos ilegalmente

RESUMO

O imidazol e seus derivados são compostos de grande interesse devido a sua eficiência enquanto catalisadores na transferência do grupo fosforila. Nesse sentido promover a clivagem de organofosforados é bastante interessante sobre tudo devido a utilização desses compostos como pesticidas, armas químicas. Nesse trabalho foi avaliado o efeito de substituintes alcoólicos no IMZ frente a reações de desfosforilação. Para isso, foram utilizados três derivados de IMZ o 1-hidroxietil imidazol (1-HEZ), 1-hidroxipropil imidazol (1-HPZ) (sintetizados) e o 4(5) hidroximetil imidazol 4(5)HMZ (comercial). Os organofosforados escolhidos foram o triéster de fosfato dietil 2,4 dinitrofenilfosfato (DEDNPP) e o diéster bis (2,4 dinitrofenil) fosfato de sódio (BDNPP). A cinética das reações foi acompanhada pela técnica de UV-Vis pelo aparecimento do produto de reação 2,4 dinitrofenolato (DNF). O mecanismo de reação foi investigado a partir das técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), efeito isotópico cinético (EIC), parâmetros termodinâmicos de ativação e por análise físico-química orgânica utilizando a equação de Bronsted. Para a reação do triéster DEDNPP com os derivados o 1-HEZ e o 1-HPZ, os resultados de EIC com valores próximos de 1 e parâmetros termodinâmicos com entropia bastante negativa, evidenciaram que ambos os derivados reagem por mecanismos semelhantes de catálise nucleofílica com ataque do anel de imidazol sobre o átomo de fósforo. Na análise de RMN de ^{31}P não foram detectados intermediários de reação fosforilados, devido à alta instabilidade dos mesmos, sendo observados apenas o organofosforado de partida e o produto final (fosfato de dietila). Na análise por EM foram detectadas todas as peças chave de reação, inclusive o intermediário fosforilado. Além disso, o *plot* de Bronsted evidenciou uma reta, típico de mecanismo concertado. As reações com o diéster de fosfato BDNPP foram estudadas com os hidroxiimidazóis 1-HEZ, 1-HPZ e 4(5)HMZ. Nesse caso foi observado valores de EIC secundário (*i.e.* entre 1 e 2) indicando que nesse caso a hidroxila poderia estar influenciando o mecanismo de reação. A partir dos valores de EIC combinado com os parâmetros termodinâmicos foi proposto um mecanismo de catálise nucleofílica combinada com a estabilização do estado de transição por uma ligação de hidrogênio do grupo hidroxila dos hidroxiimidazóis. A partir do estudo por RMN de ^{31}P para BDNPP com o 1-HEZ, foi observado o intermediário fosforilado, incomum para derivados de IMZ na posição 1, indicando que a ligação de hidrogênio com a porção fosfato pode estabilizar o intermediário de reação. Para o 4(5)HMZ foram observados, além do intermediário fosforilado, outras espécies evidenciando que a troca de posição da hidroxila tornou o mecanismo reacional mais complexo, inclusive com a detecção de um inesperado produto O-fosforilado. Por fim, os incrementos catalíticos observados para o DEDNPP ($\sim 10^5$ vezes) e para o BDNPP ($\sim 10^6$ vezes) mostraram o grande poder catalítico desses compostos e sua promissora aplicação. De maneira geral, esse estudo foi importante para elucidar o efeito de substituintes em derivados de IMZ com potencial para interações intramoleculares. Isso é promissor para compreensão de sítios enzimáticos e também para projeção de catalisadores e detoxificantes proeminentes.

Palavras-chave: Hidroxiimidazol. Mecanismo de reação. Organofosforados.

ABSTRACT

Imidazole and its derivatives are compounds of great interest because of their efficiency as catalysts in phosphoryl transfer. In this sense promoting the cleavage of organophosphates is quite interesting because they are used as pesticides, chemical weapons. In this work the effect of alcoholic substituents in IMZ towards the dephosphorylation reactions was evaluated. For this, two IMZ derivatives were synthesized: 1-hydroxyethyl imidazole (1-HEZ), 1-hydroxypropyl imidazole (1-HPZ) and one commercial 4(5) hydroxymethylimidazole (4(5) HMZ) were used. The chosen organophosphates were the triester 2,4-dinitrophenyl phosphate (DEDNPP) and sodium bis (2,4-dinitrophenyl) phosphate (BDNPP). The reaction kinetics were accompanied by the UV-Vis technique by the appearance of the reaction product 2,4 dinitrophenolate (DNF). The reaction mechanism was investigated using nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (EM), kinetic isotope effect (EIC), thermodynamic activation parameters and organic physicochemical analysis using the Bronsted equation. For the reaction with DEDNPP with the derivatives 1-HEZ and 1-HPZ, the EIC results with values close to 1 and thermodynamic parameters with a very negative entropy showed that both derivatives react by similar mechanisms of nucleophilic catalysis, with the imidazole ring attacking the phosphorus atom. In the ^{31}P NMR analysis no phosphorylated reaction intermediates were detected due to the high instability of the same and only the starting organophosphate and the final product (diethyl phosphate) were observed. In the MS analysis all the key pieces of reaction were detected, including the phosphorylated intermediate. In addition, the Bronsted plot showed a straight line, typical of a concerted mechanism. Reactions with the BDNPP were studied with 1-HEZ, 1-HPZ and 4 (5) HMZ hydroxyimidazoles. In this case, secondary EIC values (i.e., between 1 and 2) were observed indicating that in this case the hydroxyl could be influencing the reaction mechanism. From the EIC values combined with the thermodynamic parameters it has been proposed a nucleophilic catalysis mechanism combined with the stabilization of the transition state by a hydrogen bond of the hydroxyl group of the hydroxyimidazoles. From the ^{31}P NMR study for BDNPP with 1-HEZ, the phosphorylated intermediate, unusual for IMZ derivatives at position 1, was observed, indicating that hydrogen bonding with the phosphate moiety can stabilize the reaction intermediate. For the 4(5) HMZ, other species were observed besides the phosphorylated intermediate, evidencing that the hydroxyl position change made the reaction mechanism more complex, including the detection of an unexpected O-phosphorylated product. Finally, the catalytic increases observed for DEDNPP ($\sim 10^5$ -fold) and BDNPP ($\sim 10^6$ -fold) showed the great catalytic power of these compounds and their promising application. In general, this study was important to elucidate the effect of substituents on IMZ derivatives with potential for intramolecular interactions. This is promising for understanding enzyme sites and also for projection of prominent catalysts and detoxifiers.

Key-words: Hydroxyimidazole. Reaction mechanism. Organophosphates.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GRÁFICO DO LOG DA CONSTANTE DE VELOCIDADE VERSUS pK_{BH} PARA REAÇÕES DE ELIMINAÇÃO E MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO	14
FIGURA 2 - GRÁFICO DE COORDENADA REACIONAL TÍPICO DE REAÇÕES CATALISADAS E NÃO CATALISADAS	15
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DOS SÍTIOS CATALÍTICOS DAS CISTEINO PROTEASES (A), SERINO PROTEASES (B) E MECANISMO PROPOSTO PARA RNASE T1 (C).....	17
FIGURA 4 – MODELO MIMÉTICO SINTÉTICO DA QUIMOTRIPSINA.....	18
FIGURA 5 – LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTERMOLECULARES PARA O IMIDAZOL NO ESTADO SÓLIDO.....	19
FIGURA 6 - INFLUÊNCIA DOS SUBSTITUINTES NA ESTRUTURA CRISTALINA DOS DERIVADOS DE IMIDAZOL.....	20
FIGURA 7 - DERIVADOS DE IMZ COM IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E FARMACOLÓGICA.....	21
FIGURA 8 - ESTRUTURAS DE DESLOCALIZAÇÃO DE ELÉTRONS (A) E ORBITAIS MOLECULARES DO IMZ (B)	21
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DO pK_{AH} DOS DERIVADOS DE IMZ INFLUENCIADOS PELOS GRUPOS SUBSTITUINTES.....	22
FIGURA 10 - EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO PARA O IMZ (A) E PARA O 4(5)METIL(IMIDAZOL)	23
FIGURA 11 - EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO PARA A HISTIDINA.....	23
FIGURA 12 - EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO TIO-TIONA PARA O METIMAZOL (A) E IMIDAZOL-IMIDAZOLONA (B).....	24
FIGURA 13 - MECANISMO DA REAÇÃO ENTRE IMZ E ACETATO DE p-NITROFENILA EM MEIO AQUOSO	25
FIGURA 14 - COORDENADA DE REAÇÃO PARA CATÁLISE BÁSICA E NUCLEOFÍLICA DE ÉSTERES CARBOXÍLICOS PELO IMZ	26
FIGURA 15 - MODELOS INTRAMOLECULARES CONTENDO IMIDAZOL.....	27
FIGURA 16 - MODELO INTRAMOLECULAR CONTENDO IMIDAZOL E ÁCIDO CARBOXÍLICO.....	27
FIGURA 17 - MECANISMO DE CATÁLISE BÁSICA INTRAMOLECULAR COMBINADA COM CATÁLISE NUCLEOFÍLICA.....	28

FIGURA 18 - REAÇÃO DE HIDROXIIMIDAZÓIS VIA ATAQUE NUCLEOFÍLICO DO OXIGÊNIO.....	29
FIGURA 19 - REAÇÕES DE 2-HIDROXIIMIDAZOIS COM UMA LACTAMA MODELO	29
FIGURA 20 - MONO, DI E TRIÉSTERES, RESPECTIVAMENTE ONDE R _{1,2,3} REPRESENTAM SUBSTITUINTES	30
FIGURA 21 - CARGA NEGATIVA EM DIESTERES DE FOSFATO; ESTABILIZAÇÃO DO FÓSFORO	31
FIGURA 22 - ORGANOFOSFORADOS DA SÉRIE G	32
FIGURA 23 - ORGANOFOSFORADOS EM PROCESSO DE DESCONTINUIDADE E BANIMENTO (TRACEJADO) OU COM USO NÃO AUTORIZADO ENCONTRADOS EM AMOSTRA DE ALIMENTOS.....	33
FIGURA 24 - POSSÍVEIS ATAQUES NUCLEOFÍLICOS EM UM ÉSTER DE FOSFATO	33
FIGURA 25 - CAMINHOS REACIONAIS PARA ÉSTERES DE FOSFATO	34
FIGURA 26 - REAÇÕES COM ÉSTERES DE FOSFATO INTRA E INTERMOLECULARES	35
FIGURA 27 - COMPOSTOS AVALIADOS NESSE TRABALHO.....	37
FIGURA 28 - SÍNTESE DOS HIDROXIIMIDAZOIS 1-HPZ E 1-HEZ	39
FIGURA 29 - DERIVATIZAÇÃO DO 1-HPZ E IMZ COM ANIDRIDO BENZOICO	39
FIGURA 30 - HIDRÓLISE ALCALINA DO COMPOSTO 1	40
FIGURA 31 - SÍNTESE DO DEDNPP	40
FIGURA 32 – (A) ESPECTROS SUCESSIVOS PARA A REAÇÃO DO 1-HPZ (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 8,97) COM DEDNPP E (B) AJUSTE DO PERFIL CINÉTICO TÍPICO (400 nm) COM A EQUAÇÃO 2.....	42
FIGURA 33 - ESPECTROS DE RMN ¹ H PARA O 1-HEZ E 1-HPZ	44
FIGURA 34 - ESPECTROS DE ¹ H E ³¹ P PARA O DEDNPP	46
FIGURA 35 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA O 1-HPZ E 1-HEZ	47
FIGURA 36 - EQUILÍBRIOS ÁCIDO-BASE APRESENTADOS PELOS HIDROXIIMIDAZOIS	48
FIGURA 37 - GRÁFICOS DE PH <i>VERSUS</i> VOLUME DE BASE PARA OS COMPOSTOS 1-HPZ E 1-HEZ. A LINHA SÓLIDA CORRESPONDE AO AJUSTE TEÓRICO.....	49
FIGURA 38 - REAÇÕES POSSÍVEIS COM O DEDNPP	51

FIGURA 39 - PERFIL DE pH PARA AS REAÇÕES DO DEDNPP COM OS HIDROXIMIDAZOIS 1-HEZ E 1-HPZ	52
FIGURA 40 - EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE EM D ₂ O	54
FIGURA 41 - PERFIL DE pD PARA AS REAÇÕES ENTRE O DEDNPP E O 1-HEZ E 1-HPZ.....	55
FIGURA 42 - GRÁFICOS DE EYRING PARA A REAÇÃO DO 1-HEZ (A) E 1-HPZ (B) COM DEDNPP	56
FIGURA 43 - MECANISMO DE CATÁLISE NUCLEOFÍLICA PROPOSTO PARA A REAÇÃO DO 1-HEZ COM O DEDNPP	57
FIGURA 44 – (A) ESPECTROS DE RMN ³¹ P DA REAÇÃO 1-HEZ (0,7 mol L) COM DEDNPP (7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹) E (B) REAÇÃO 1-HPZ (0,7 mol L ⁻¹) COM DEDNPP (7,5x10 ⁻³ mol/L), pH 9.....	59
FIGURA 45 - INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS COM DERIVADOS DE IMZ N- SUBSTITUÍDOS (A) E NÃO N-SUBSTITUÍDOS (B)	60
FIGURA 46 - INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS AVALIADOS EM ESTUDO ANTERIOR.....	60
FIGURA 47 - ESI-MS (+) DA REAÇÃO DO DEDNPP (8x10 ⁻³ mol L ⁻¹) COM 1-HEZ (2,5 x 10 ⁻² mol L ⁻¹), pH 9 e 25 °C.....	61
FIGURA 48 - ESPECTRO MS/MS (+) DO ÍON M/Z=249,08.....	61
FIGURA 49 - POSSÍVEIS FRAGMENTOS PARA OS INTERMEDIÁRIOS DE REAÇÃO DO 1-HEZ E DEDNPP	62
FIGURA 50 - ROTAS PARA DECOMPOSIÇÃO DO INTERMEDIÁRIO DE REAÇÃO DO 1-HEZ COM O DEDNPP.....	62
FIGURA 51 - ESI-MS (-) DA REAÇÃO DO DEDNPP (8X10 ⁻³ mol.L ⁻¹) COM 1-HEZ (2,5 X 10 ⁻² mol.L ⁻¹) A pH 9 (25 °C)	63
FIGURA 52 - ESI-MS (+) DA REAÇÃO DO DEDNPP (8X10 ⁻³ mol L ⁻¹) COM 1-HPZ (2,5 X 10 ⁻² mol L ⁻¹) A pH 9 (25 °C).....	64
FIGURA 53 - ROTAS PARA DECOMPOSIÇÃO DO INTERMEDIÁRIO DE REAÇÃO DO 1-HPZ COM O DEDNPP.....	64
FIGURA 54 - ESPECTRO MS/MS (+) DO ÍON M/Z=263.....	65
FIGURA 55 - POSSÍVEIS FRAGMENTOS PARA OS INTERMEDIÁRIOS DE REAÇÃO DO 1-HPZ E DEDNPP	65
FIGURA 56 - ESI-MS (-) DA REAÇÃO DO DEDNPP (8X10 ⁻³ mol L ⁻¹) COM 1-HPZ (2,5 X 10 ⁻² mol L ⁻¹) A pH 9 (25 °C).....	66

FIGURA 57 - REAÇÕES CONSECUTIVAS DO BDNPP	67
FIGURA 58 - PERFIL CINÉTICO DA REAÇÃO DO 1-HEZ (0,1 mol L ⁻¹) COM BDNPP A 25°C E pH 8 AJUSTADOS (LINHA SÓLIDA) COM A EQUAÇÃO TÍPICA DE PRIMEIRA ORDEM (A) E COM A EQUAÇÃO 12 DE REAÇÕES CONSECUTIVAS (B)	68
FIGURA 59 - PERFIS DE pH PARA AS REAÇÕES DO BDNPP COM OS HIDROXIIMIDAZOIS À 25°C. AS LINHAS TRACEJADAS CORRESPONDEM AO AJUSTE COM A EQUAÇÃO 5.....	69
FIGURA 60 - PERFIS DE pD PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM BDNPP	70
FIGURA 61 - MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÕES ENTRE OS HIDROXIIMIDAZOIS E O BDNPP.....	71
FIGURA 62 - ESPECTROS DE RMN ³¹ P DA REAÇÃO 1-HPZ (0,7 mol L) COM BDNPP (7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹), pH 9,2, TEMPERATURA AMBIENTE.	72
FIGURA 63 - ESPECTROS DE RMN ³¹ P DA REAÇÃO 1-HEZ (0,7 mol L) COM BDNPP (7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹), pH 9,15.	73
FIGURA 64 - ESPECTROS DE RMN ³¹ P DA REAÇÃO 4(5)-HMZ (0,7 mol L) COM BDNPP (7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹), pH 9,1, temperatura ambiente.	74
FIGURA 65 - POSSÍVEIS INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS.....	75
FIGURA 66 - PROPOSTA DE FORMAÇÃO DO BisFHMZ.....	75
FIGURA 67 – PROPOSTA DE FORMAÇÃO DO PRODUTO EHMZ.....	76
FIGURA 68 - PLOT DE BRONSTED PARA AS REAÇÕES COM DEDNPP	77
FIGURA 69 - GRÁFICO DE BRONSTED PARA REAÇÃO DO BDNPP	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRÊMIOS NOBEL RELACIONADOS A CATÁLISE.....	16
TABELA 2 – PONTOS DE FUSÃO E EBULIÇÃO PARA DERIVADOS DE IMZ <i>N</i> - SUBSTITUÍDOS.....	20
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	43
TABELA 4 - VALORES DE pK_{aH} DETERMINADOS PARA OS HIDROXIIMIDAZOIS	49
TABELA 5 – PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS PARA AS REAÇÕES DO 1- HEZ E 1-HPZ COM O DEDNPP	53
TABELA 6 – EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM DEDNPP	56
TABELA 7 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM DEDNPP	57
TABELA 8 - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A REAÇÃO COM O BDNPP E OS HIDROXIIMIDAZOIS	69
TABELA 9 - EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM BDNPP	71
TABELA 10 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS REAÇÕES DOS DERIVADOS 1-HEZ, 1-HPZ E 4(5)HMZ COM BDNPP ^a	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

1-HEZ - 1(2-HIDROXIETIL)IMIDAZOL
1-HPZ - 1(3-HIDROXIPROPIL)IMIDAZOL
1-MEI - 1-METILIMIDAZOL
4(5)HMZ - 4(5)(HIDROXIMETIL)IMIDAZOL
ADP - DIFOSFATO DE ADENOSINA
ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA
ATP - TRIFOSFATO DE ADENOSINA
BDNPP - BIS (2,4-DINITROFENIL) FOSFATO DE SÓDIO
CID - DISSOCIAÇÃO POR COLISÃO INDUZIDA
DCI - CLORETO DE DEUTÉRIO
DEDNPP - DIETIL 2,4-DINITROFENIL FOSFATO
DFF - 2,4-DINITROFENIL FOSFATO
DIMZ - DERIVADO DE IMIDAZOL
DNA - ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DNF - 2,4-DINITROFENOLATO
EIC - EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO
EM - ESPECTROMETRA DE MASSAS
ESI - IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*
ET - ESTADO DE TRANSIÇÃO
FDE - FOSFATO DE DIETILA
FI - FOSFATO INORGÂNICO
HCl - ÁCIDO CLORÍDRICO
IMZ – IMIDAZOL
INT - INTERMEDIÁRIO
J - CONSTANTE DE ACOPLAMENTO
 k_0 - HIDRÓLISE ESPONTÂNEA
 k_N - CONSTANTE NUCLEOFÍLICA
 k_{OBS} - CONSTANTE DE VELOCIDADE OBSERVADA
 k_{OH} - HIDRÓLISE ALCALINA
KOH - HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO
LTQ-XL - ESPECTROMETRIA DE CAPTURA DE ÍONS

NaOD - DEUTERÓXIDO DE SÓDIO

PARA - PROGRAMA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS

ppm - PARTES POR MILHÃO

PTE - PRODUTO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

RLEL - RELAÇÕES LINEARES DE ENERGIA LIVRE

RMN - RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

RNA - ÁCIDO RIBONUCLEICO

TBA - CLORETO DE TRIMETILBENZILAMÔNIO

THF - TETRAIDROFURANO

TMS - TRIMETILSILANO

UV-VIS - ULTRAVIOLETA VISÍVEL

ΔG^\ddagger - VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE GIBBS PARA O ESTADO DE TRANSIÇÃO

ΔH^\ddagger - VARIAÇÃO DE ENTALPIA PARA O ESTADO DE TRANSIÇÃO

ΔS^\ddagger - VARIAÇÃO DA ENTROPIA PARA O ESTADO DE TRANSIÇÃO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CINÉTICA QUÍMICA E CATÁLISE	13
1.2	CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	16
1.3	IMIDAZOL E DERIVADOS	19
1.3.1	IMIDAZOL COMO CATALISADOR	24
1.3.2	HIDROXIIMIDAZOIS	28
1.4	COMPOSTOS ORGANOFOFORADOS	30
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	37
3.1.1	Objetivo Geral.....	37
3.1.2	Objetivos Específicos	37
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	MATERIAIS	38
4.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS DE IMIDAZOL.....	38
4.3	SÍNTESE DO DEDNPP.....	40
4.4	CARACTERIZAÇÃO	41
4.5	ACOMPANHAMENTO CINÉTICO	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	43
5.2	ESTUDO DA REATIVIDADE DOS HIDROXIIMIDAZOIS NAS REAÇÕES COM ORGANOFOFORADOS	50
5.2.1	Estudo cinético das reações dos hidroimidazois com o triéster DEDNPP	50
5.2.2	Análise por RMN ³¹ P das reações dos hidroxiimidazois com DEDNPP	58
5.2.3	Análise por EM das reações dos hidroxiimidazois com DEDNPP	60
5.2.4	Estudo cinético das reações dos hidroimidazois com o diéster BDNPP	66
5.2.5	Análise por RMN ³¹ P das reações dos hidroxiimidazois com BDNPP	72
5.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA ORGÂNICA.....	76
	REFERENCIAS.....	81
	APÊNDICE A – DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES	90
	APÊNDICE B – DADOS EXPERIMENTAIS COMPLEMENTARES.....	95

1 INTRODUÇÃO

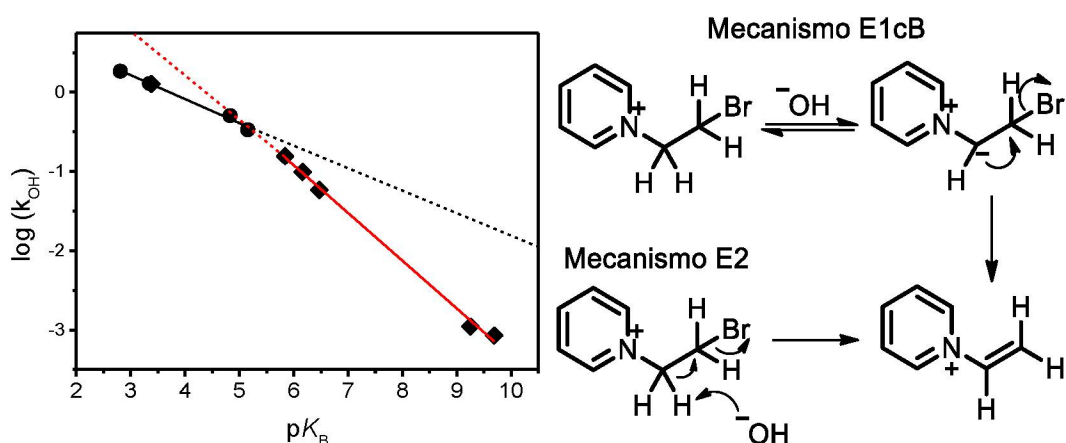
1.1 CINÉTICA QUÍMICA E CATÁLISE

A cinética química é uma das ferramentas utilizadas em química na qual, através de medidas da variação de grandezas relacionadas à concentração dos reagentes em relação ao tempo, permite determinar diversos parâmetros relacionados a um sistema de interesse. O estudo cinético de reações químicas teve início quando o químico Ludwig Wilhelmy, em 1850, ao estudar a reação de inversão da sacarose percebeu que a velocidade instantânea da reação era proporcional à concentração dos reagentes, assim sendo capaz de, empiricamente, propor uma equação condizente com os dados experimentais.¹ Vinte anos mais tarde, Berthelot e Gilles ao estudarem a reação de esterificação do ácido acético por etanol mostraram que a reação não se procedia até a conversão total dos reagentes. Assim, propuseram uma equação para reações em equilíbrio, que se adequava ao sistema estudado.² O estudo cinético de reações continuou ao longo dos anos e antes dos anos 1900, processos autocatalíticos, reações paralelas e consecutivas já haviam sido analisados. Além disso, os efeitos de solvente e da temperatura já haviam sido avaliados, sendo que, no ano de 1889 Arrhenius propôs a sua clássica equação que correlaciona a constante de velocidade de uma reação com a temperatura.^{1,2}

Atualmente, o avanço dos aparatos técnicos permite que diversos sistemas possam ter sua cinética estudada. Podemos acompanhar a cinética de reações utilizando equipamentos de ultravioleta visível (UV-Vis),³ cromatografia,⁴ ressonância magnética nuclear (RMN),⁵ entre outros. Em resumo, qualquer equipamento que possa nos fornecer uma medida relacionada à concentração pode ser utilizado para obter parâmetros cinéticos, que pode ser determinante na elucidação mecanística (e.g. de reações orgânicas)⁶ e compreensão de como processos ocorrem (e.g. na formação de nanopartículas metálicas).⁷ Ainda, o desenvolvimento de *softwares* que permitem ajustes matemáticos não-lineares facilita o tratamento de dados para sistemas mais complexos (*i.e* não lineares). Os dados obtidos a partir do acompanhamento cinético das reações nos dizem muito mais que apenas o quão rápido ocorre determinada reação. Podemos inferir sobre mecanismos reacionais, obter parâmetros termodinâmicos e combiná-los para construir gráficos de relações

lineares de energia livre (RLEL).⁸ Nesse sentido, a físico-química orgânica é uma área que se destaca por utilizar ferramentas da físico-química para elucidar questões de estrutura e reatividade de compostos orgânicos. Essa área de pesquisa que surgiu no início dos anos 1900 viu-se no final do mesmo século próximo a sua extinção, a partir da percepção de alguns químicos de que a compreensão da reatividade de compostos orgânicos não era mais importante.⁸ Entretanto, com a expansão da química bioinorgânica, química de materiais e química supramolecular a questão da reatividade voltou a estar em voga, permitindo com que ela pudesse ressurgir. Um exemplo de como a físico química orgânica pode contribuir na compreensão mecanística é dado abaixo. Ao investigar a reação de formação de cátions vinil-*N*-piridínicos em reações de eliminação Bunting e colaboradores variaram os substituintes no anel piridínico e verificaram a mudança na constante de velocidade.⁹ Foi construído o gráfico do logaritmo da constante de velocidade *versus* o pK_B da vinil-*N*-piridina (Figura 1). Essa RLEL é conhecida como *plot* de Bronsted onde conhecidamente reações com mecanismos de uma etapa apresentam gráficos lineares e mecanismos de duas etapas apresentam “quebras de linearidade” onde há duas retas sobrepostas.

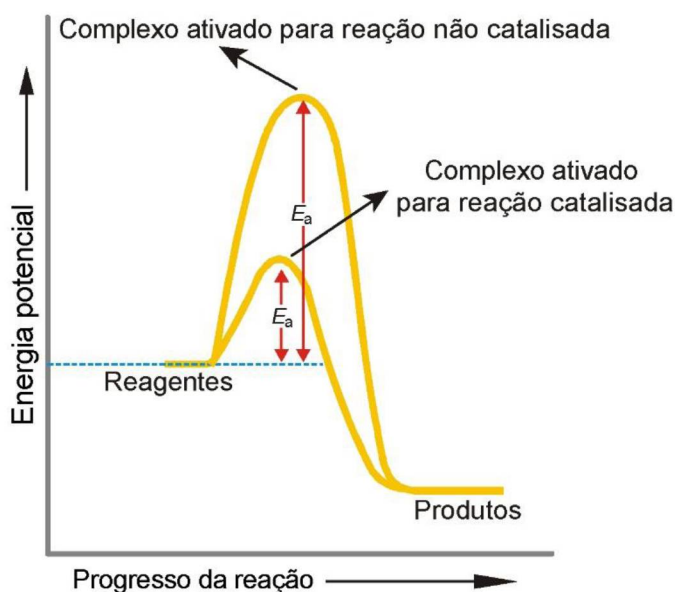
FIGURA 1 - GRÁFICO DO LOG DA CONSTANTE DE VELOCIDADE VERSUS pK_{BH} PARA REAÇÕES DE ELIMINAÇÃO E MECANISMOS DE ELIMINAÇÃO



No caso apresentado acima os autores foram capazes de diferenciar entre o mecanismo de eliminação bimolecular (E2) e eliminação unimolecular da base conjugada (E1cB), através de uma elegante análise físico químico orgânica. Ainda no contexto de cinética química, as reações, para ocorrerem, precisam ultrapassar uma barreira de energia potencial. Muitas vezes, por mais que os processos sejam

favoráveis termodinamicamente, a velocidade com que eles ocorrem é muito baixa. Em outras palavras, a barreira energética a ser ultrapassada é muito alta. Uma forma de contornar essa situação é a utilização de catalisadores. Catalisadores são por definição “compostos que aumentam a velocidade de uma determinada reação sem alterar a energia livre de Gibbs total e que são regenerados ao final do processo”.¹⁰ Nesses casos, o catalisador atua no sentido de diminuir a barreira de energia potencial no qual os reagentes precisam vencer para serem transformados em produtos, assim, facilitando com que a reação ocorra. A Figura 2 apresenta o gráfico do progresso reacional *versus* energia potencial,¹¹ para uma reação genérica catalisada e não catalisada, onde observamos que o catalisador diminui a energia potencial do complexo ativado, tornando a reação mais rápida.

FIGURA 2 - GRÁFICO DE COORDENADA REACIONAL TÍPICO DE REAÇÕES CATALISADAS E NÃO CATALISADAS



Fonte: Ref¹² (adaptado).

Processos catalisados são conhecidos desde a antiguidade, com a fermentação de açúcares sendo o mais famoso. O estudo sistemático de catalisadores começou em meados dos anos 1800, sendo que no ano de 1835 o químico sueco Jakob Berzelius cunhou o termo catálise (do grego: *kata* = totalmente *lisis* = romper) após grande discussão acadêmica e vasto trabalho experimental.¹³ Alguns processos catalisados foram tão importantes que seus idealizadores foram laureados com prêmios Nobel, sendo esses apresentados na Tabela 1.¹⁴

TABELA 1 - PRÊMIOS NOBEL RELACIONADOS A CATÁLISE

Laureado(s)	Tema	Ano
Wilhelm Ostwald	Estudo da catálise	1909
Paul Sabacher	Hidrogenação catalítica	1912
Fritz Haber	Síntese do NH_3 a partir de seus elementos	1918
Ernest O. Fischer e Geoffrey Wilkinson	Química dos compostos organometálicos	1973
John Conforth e Vladimir Prelog	Estereoquímica das reações catalisadas por enzimas	1975
Henry Taube	Mecanismos de transferencia electronica, sobretudo em complexos	1983
William S. Knowles, K. Barry Sharpless e Ryoji Noyori	Hidrogenação catalítica assimétrica	2001
Yves Chauvi, Robert Grubbs e Richard Schrock	Reações de metátese em química orgânica	2005
Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi e Akira Suzuki	Reações de acoplamento mediadas por paládio	2010

Fonte: ref.¹⁴

1.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA

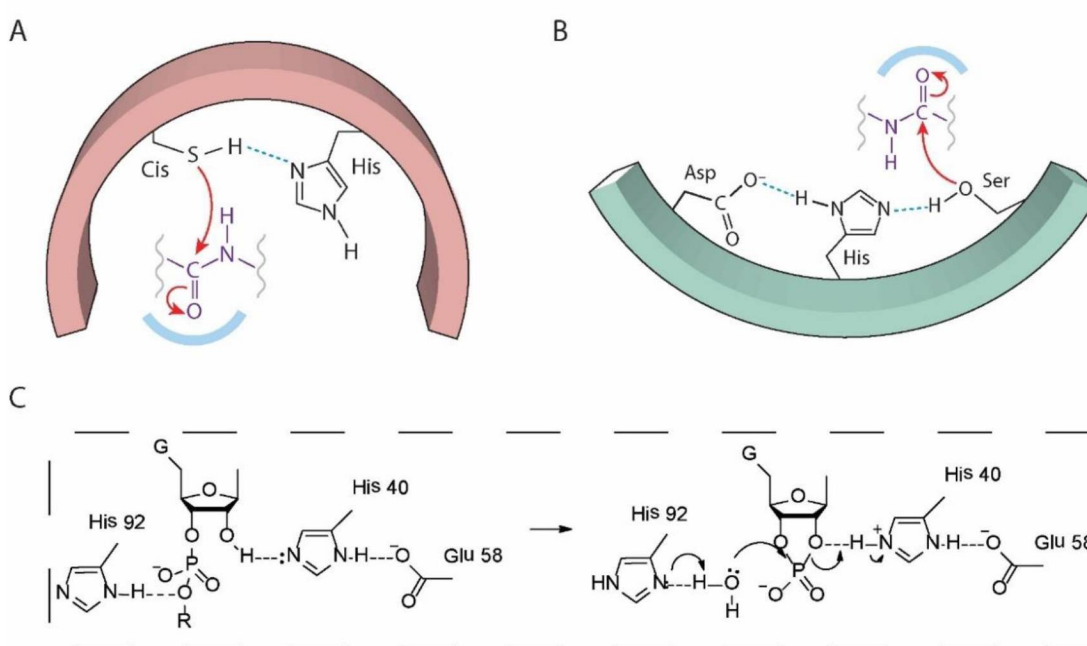
As enzimas formam uma classe de catalisadores biológicos constituídas por proteínas e que apresentam alta massa molecular. Elas chamam a atenção devido aos altos incrementos catalíticos (razão entre a constante de velocidade da reação catalisada e a constante de velocidade da reação não catalisada) que estão na ordem de $10^8 - 10^{10}$, podendo chegar a 10^{17} vezes.¹⁵ Além disso, as enzimas apresentam alta seletividade, sendo responsáveis por uma série de processos biológicos que ocorrem nos organismos vivos atuando em condições brandas de temperatura e pH.^{2,16}

A elucidação dos mecanismos de catálise enzimática é matéria de estudo há várias décadas. Devido a sua estrutura tridimensional, as enzimas são capazes de sofrer mudanças conformacionais para acomodar os substratos nos chamados sítios catalíticos. Nos sítios catalíticos estão presentes resíduos de aminoácidos que podem atuar como nucleófilos, eletrófilos, aceitar e doar ligações de hidrogênio, complexar metais, bem como, participar de processos redox. Essa estrutura bem

definida é a fonte da alta seletividade e eficiência das enzimas, uma vez que vários processos catalíticos podem ser combinados, como a catalise ácida e básica e catalise nucleofílica, além de em muitos casos o substrato ter afinidade pelo sítio ativo devido a interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas.^{16,17}

Como exemplo, podemos examinar o sítio ativo de algumas enzimas e verificar os mecanismos propostos para sua atividade enzimática. As cisteíno proteases (A) e serino proteases (B) (Figura 3), que são enzimas capazes de quebrar ligações peptídicas, tem em seu sítio catalítico os aminoácidos histidina e cisteína no caso das cisteíno proteases e aspartato, histidina e serina no caso das serino proteases. O resíduo de histidina como parte do sítio catalítico, é capaz de receber uma ligação de hidrogênio facilitando os ataques nucleofílicos dos resíduos de cisteína e serina. Nesses casos a histidina atua através de catálise básica.¹⁸ A histidina também está presente nas ribonucleases (RNases), que são enzimas responsáveis pela quebra das ligações fósforo oxigênio do RNA. Na Figura 3 (C) está apresentado um mecanismo de transfosforilação proposto para atuação da RNase T1. Nesse caso, a atuação de dois resíduos de histidina evidenciam a versatilidade desse grupamento, uma vez que ele atua como catalisador básico em um momento e catalisador ácido em outro.¹⁹

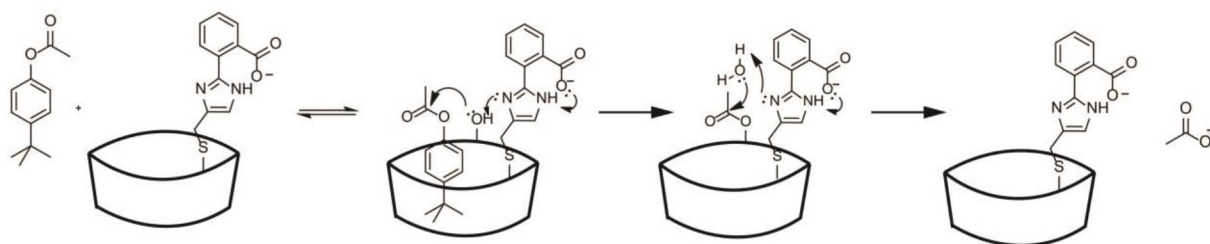
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DOS SÍTIOS CATALÍTICOS DAS CISTEÍNO PROTEASES (A), SERINO PROTEASES (B) E MECANISMO PROPOSTO PARA RNASE T1 (C)



Fonte: Ref^{18,19} (adaptado).

Nesse sentido, devido à importância biológica dos resíduos de histidina, os derivados de imidazol (IMZ) são bastante promissores, sendo que moléculas pequenas podem servir de modelo para a compreensão dos diversos efeitos que, em conjunto, determinam a efetividade da atividade enzimática. Alguns sistemas já foram desenvolvidos buscando mimetizar a atividade enzimática. Esses trabalhos têm como objetivo desenvolver catalisadores com alta seletividade e atividade para que sejam utilizados em processos industriais, bem como, para estudar mais a fundo os processos enzimáticos em sistemas mais simples. Em um trabalho anterior, D'souza e colaboradores sintetizaram uma enzima artificial, mimético da quimotripsina que continham os grupamentos carboxilato e imidazol ligados a uma ciclodextrina.²⁰ O carboxilato e o imidazol fazem o papel do sítio catalítico e a ciclodextrina comporta a porção hidrofóbica do substrato. A Figura 4 mostra o mecanismo de ação dessa enzima artificial. O anel de imidazol interage, através de uma transferência de próton, com a porção ácido carboxílico. Dessa forma o imidazol atua como catalisador básico em relação ao grupamento alcoólico vizinho, sendo esse o nucleófilo da reação. A seguir o imidazol atua como catalisador básico para hidrolisar o éster formado no sítio ativo da enzima artificial. A enzima artificial obtida nesse trabalho apresentou a vantagem de ter maior estabilidade térmica (manteve atividade até 80 °C), uma vez que a quimotripsina denatura a partir de 45 °C e a partir de 55 °C precipita. Ainda, devido a extensa cadeia de aminoácidos a enzima sofre autoclivagem pelo sitio ativo (denaturação “canibalística”) e hidrólise alcalina em condições mais drásticas de pH, problemas não observados pela enzima artificial. Além disso, a enzima artificial e a enzima biológica apresentaram atividade catalítica semelhante.

FIGURA 4 – MODELO MIMÉTICO SINTÉTICO DA QUIMOTRIPSINA



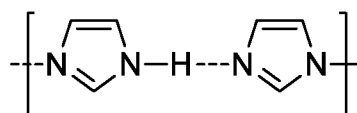
Fonte: ref²⁰

Assim a compreensão dos diversos efeitos que governam a atividade enzimática é a chave para a busca de catalisadores com propriedades ideais. Dessa forma, moléculas pequenas que consigam apresentar interações intramoleculares comuns nos sítios ativos enzimáticos são promissores catalisadores, sendo o IMZ e seus derivados uma classe de compostos que podem compreender esses requisitos.

1.3 IMIDAZOL E DERIVADOS

O IMZ é uma amina heterocíclica aromática da classe dos 1,3 diazois, planar e com um conjunto de 6 elétrons π . É altamente solúvel em água, solúvel em solventes orgânicos polares (clorofórmio, acetato de etila, metanol) e pouco solúvel em solventes orgânicos de baixa polaridade (n-hexano, benzeno, éter de petróleo).^{21,22} O IMZ em sua forma cristalina organiza-se em uma estrutura monoclinica interagindo por fortes ligações de hidrogênio N-H-N (Figura 5).²³ Tem ponto de fusão de 90 °C e ponto de ebulição de 256 °C.^{22,24}

FIGURA 5 – LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTERMOLECULARES PARA O IMIDAZOL NO ESTADO SÓLIDO



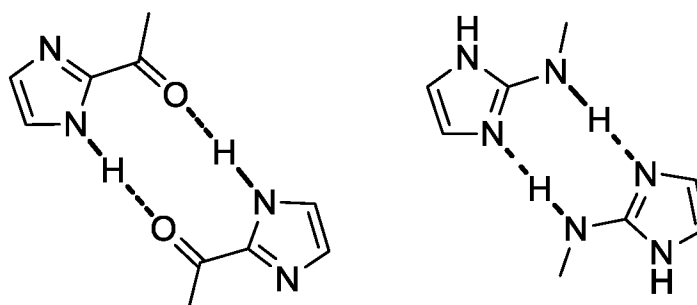
As propriedades dos derivados de IMZ são fortemente afetadas pelos grupos substituintes. Os pontos de fusão sofrem um acentuado abaixamento quando o IMZ apresenta substituintes no nitrogênio, mesmo com a massa molecular desses compostos sendo maiores em relação ao IMZ não substituído. Esse fenômeno, de forma geral, é causado pela ausência das ligações de hidrogênio N-H-N intermoleculares devido ao substituinte. A Tabela 2 apresenta os dados de ponto de fusão e ebulição para alguns derivados de IMZ *N*-substituídos. Quando os substituintes presentes nos derivados de IMZ podem doar ou aceitar ligações de hidrogênio, essas interações podem mudar a estrutura cristalina dos compostos fazendo com que eles interajam na forma de dímeros, como apresentado na Figura 6 para o *N*-metil-2-amino(imidazol) e para a (1*H*-Imidazo-2-il)etanona.²⁵

TABELA 2 – PONTOS DE FUSÃO E EBULIÇÃO PARA DERIVADOS DE IMZ *N*-SUBSTITUÍDOS

Composto	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)
Imidazol	90 ^a	256 ^{a,b}
1-Metil(imidazol) (1-MEI)	- 6 ^c	198 ^c
1-Hidroximetil(imidazol)	36-38 ^d	n.d.
1-Fenil(imidazol)	54-55 ^e	277 ^a
1-Benzil(imidazol)	70,7 ^f	310 ^g

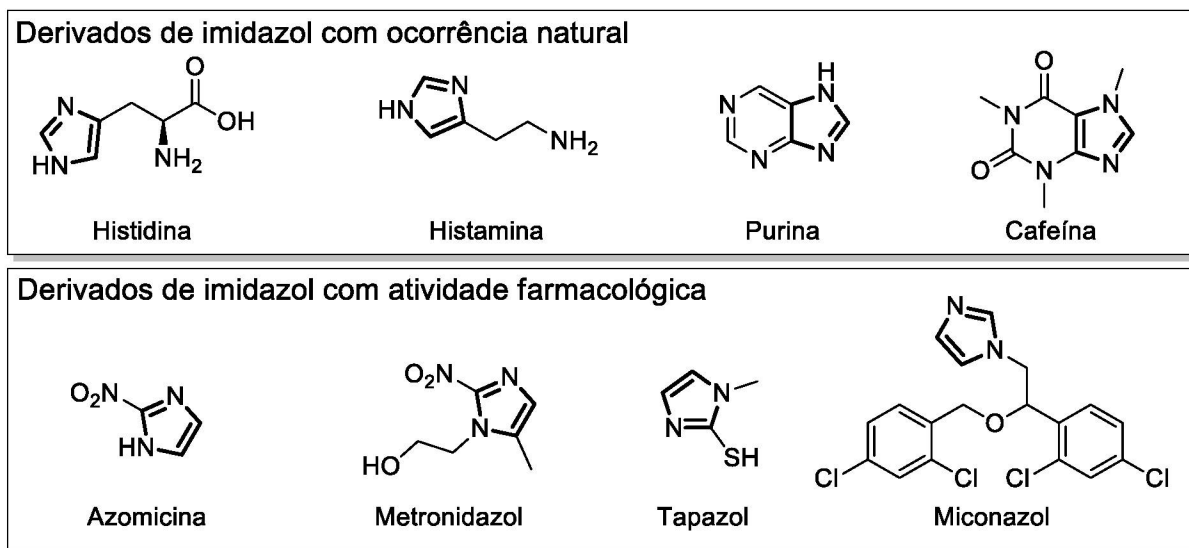
FONTE: a²², b²⁴, c²⁶, d²⁷, e²⁸, f²⁹, g³⁰ n.d. = não determinado

FIGURA 6 - INFLUÊNCIA DOS SUBSTITUINTES NA ESTRUTURA CRISTALINA DOS DERIVADOS DE IMIDAZOL



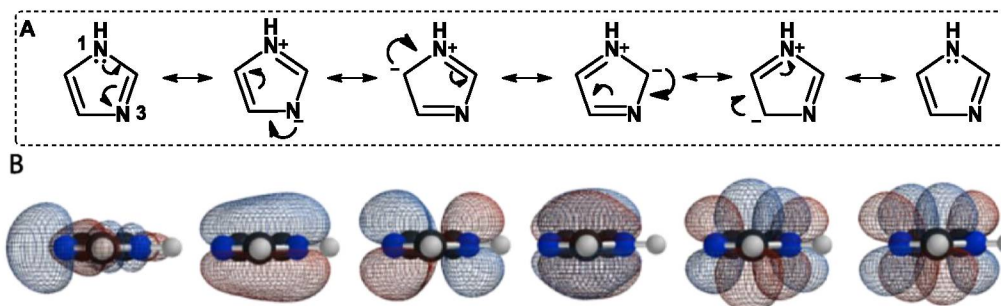
O grupo IMZ está presente em diversos compostos com atividade biológica sendo eles de origem natural ou sintética. A Figura 7 traz alguns dos mais conhecidos derivados de IMZ com atividade biológica, sendo os de ocorrência natural mais conhecidos são o aminoácido histidina e sua forma descarboxilada, a histamina. A histamina é gerada nos organismos a partir da histidina e é responsável por vários processos biológicos em nosso organismo como os inflamatórios, de secreção do suco gástrico e neurotransmissão. Dentre os processos regulados no sistema nervoso estão o regulamento dos batimentos cardíacos, aprendizado e memória.³¹ A purina faz parte das bases nitrogenadas presentes no DNA e a cafeína é amplamente conhecida pelos seus efeitos estimulantes e por estar presente em bebidas como o café. Os compostos derivados de IMZ tem conhecida atividade anti-histaminica, anti-cancer, anti-fungica, anti-helmíntica,³² sendo o estudo das atividade biológica dessa classe de moléculas bastante vasto, dentre esses compostos estão a azomicina, metronidazol, tapazol e miconazol(8).³³

FIGURA 7 - DERIVADOS DE IMZ COM IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E FARMACOLÓGICA



A versatilidade química do IMZ está relacionada à sua estrutura, sendo que a Figura 8 mostra a estrutura de deslocalização de elétrons do IMZ (A) juntamente com a representação dos orbitais moleculares (B).³⁴ O nitrogênio 1 (tipo pirrol) tem seu par de elétrons não ligante em orbital p paralelo aos orbitais p dos outros átomos do anel, formando um conjunto de orbitais π . Assim, esse par de elétrons participa da delocalização de eletrônica, e não apresenta a basicidade característica de aminas.^{22,35} Por outro lado, o nitrogênio 3, que está na forma de imina, apresenta um par de elétrons em orbital sigma não ligante, sendo esse não comprometido com a ressonância do anel, possuindo caráter básico.

FIGURA 8 - ESTRUTURAS DE DESLOCALIZAÇÃO DE ELÉTRONS (A) E ORBITAIS MOLECULARES DO IMZ (B)

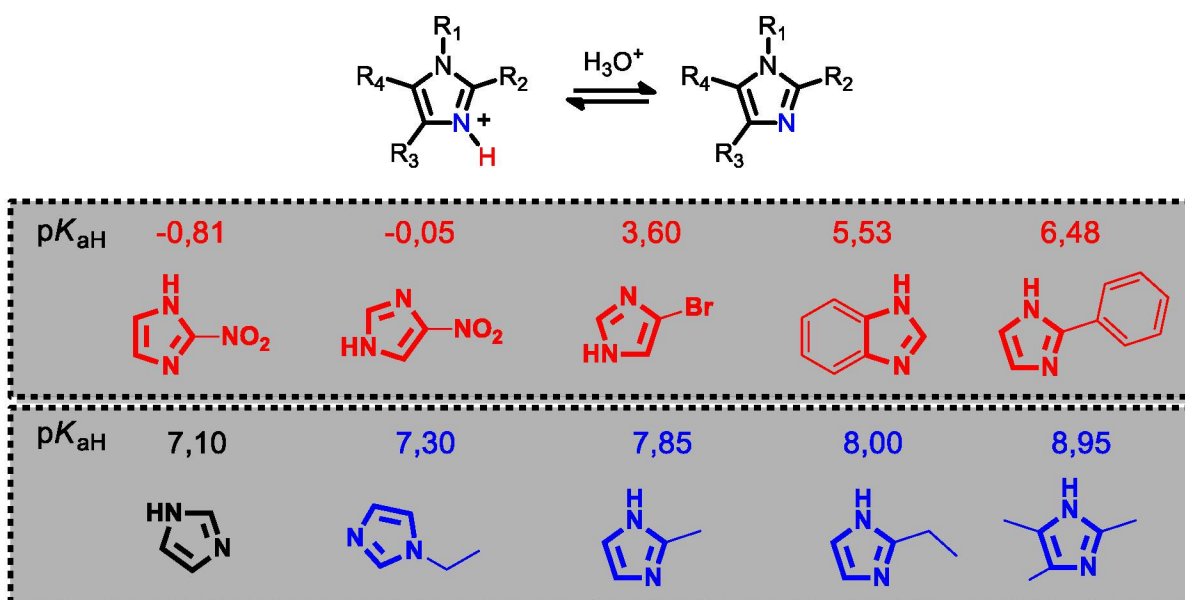


A estrutura eletrônica do IMZ faz com que os nitrogênios presentes na estrutura tenham características distintas. O nitrogênio imínico do IMZ (tipo piridina)

confere a basicidade característica do IMZ ($pK_{aH} = 7,1$ em água),³⁶ e através da reatividade desse par eletrônico, o IMZ consegue promover catálise básica e nucleofílica e quando protonada a estrutura pode promover catálise ácida. Por outro lado, o nitrogênio (1) do tipo pirrol não é protonado com facilidade devido à quebra do sistema aromático, onde estima-se um valor do pK_{aH} negativo para esse equilíbrio de protonação.³⁵

Os valores de pK_{aH} dos derivados de IMZ também são afetados pelos grupos substituintes presentes no anel. É conhecido que grupamentos retiradores de elétrons (e.g. halogênios), quando substituídos no anel, fazem com que o pK_{aH} do nitrogênio (tipo piridina) diminua. Por outro lado, o mesmo pK_{aH} aumenta se grupos doadores de elétrons são adicionados ao anel (e.g. metila). A Figura 9 apresenta uma série de imidazóis substituídos e seu respectivo valor de pK_{aH} . Podemos perceber ainda que o efeito retirador de elétrons é muito mais pronunciado, a ponto do nitroderivados de IMZ apresentarem basicidade praticamente nula, sendo protonados apenas em condições fortemente ácidas.

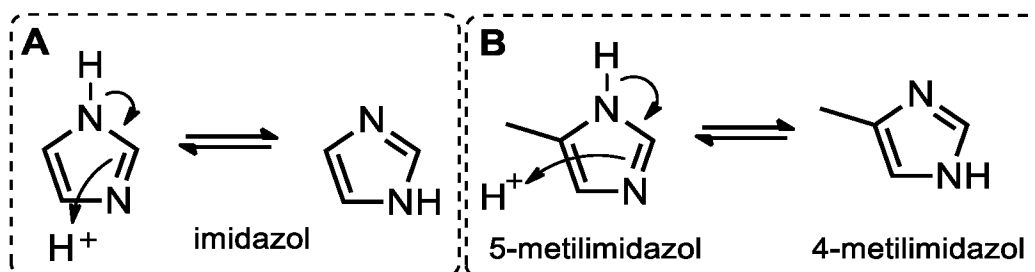
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DO pK_{aH} DOS DERIVADOS DE IMZ INFLUENCIADOS PELOS GRUPOS SUBSTITUINTES



Outra característica interessante apresentada pelos compostos derivados de IMZ é o equilíbrio tautomérico. Esse equilíbrio ocorre através da migração do hidrogênio de um nitrogênio ao outro, que no caso do IMZ leva a estruturas

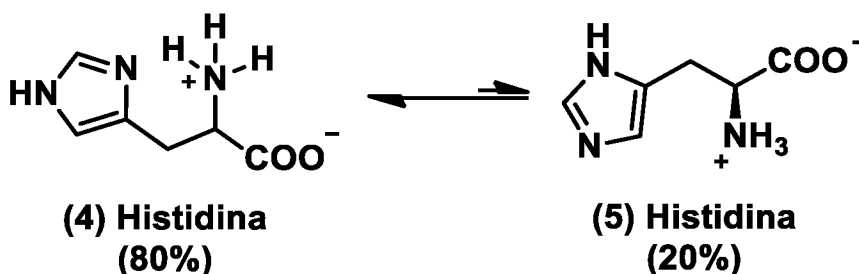
simétricas, Figura 10(A). Quando a substituição ocorre nas posições 1 ou 2 não ocorre a formação de pares tautoméricos pois, no primeiro caso, há a impossibilidade de migração do hidrogênio devido a substituição. No segundo caso, assim como para o IMZ as estruturas formadas são simétricas, não sendo possível diferenciá-los. Nos derivados com substituintes na posição 4, como mostrado no Figura 10(B) para o 4(5)-metilimidazol, tem-se a formação de tautômeros assimétricos, sendo que esses podem apresentar características diferenciadas, como a reatividade.⁵

FIGURA 10 - EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO PARA O IMZ (A) E PARA O 4(5)METIL(IMIDAZOL)



Interações intramoleculares ainda podem afetar o equilíbrio tautomérico em solução. Por exemplo, para a histidina o equilíbrio é deslocado para o tautômero de posição 4 devido a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecula (Figura 11).³⁷

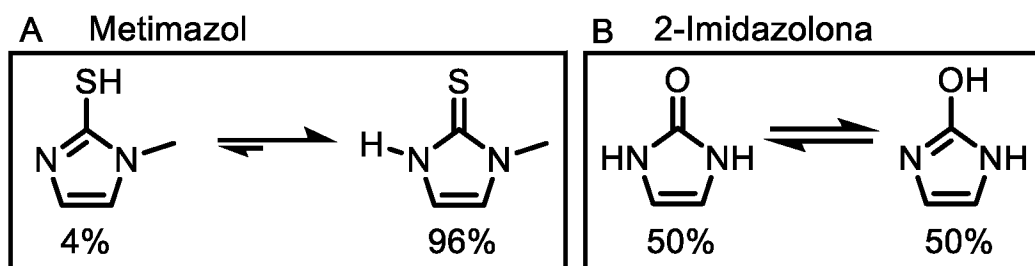
FIGURA 11 - EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO PARA A HISTIDINA



Ainda vale destacar a existência de outros equilíbrios tautométicos quando grupamentos tióis (Figura 12 A) ou hidroxilas (Figura 12 B) estão ligados diretamente ao anel imidazólico, um composto importante que apresenta essa característica é o

fármaco metimazol (tapazol). Nesses casos os equilíbrios são deslocados as estruturas do tipo tiona e imidazolona.³⁸

FIGURA 12 - EQUILIBRIO TAUTOMÉRICO TIO-TIONA PARA O METIMAZOL (A) E IMIDAZOL-IMIDAZOLONA (B)

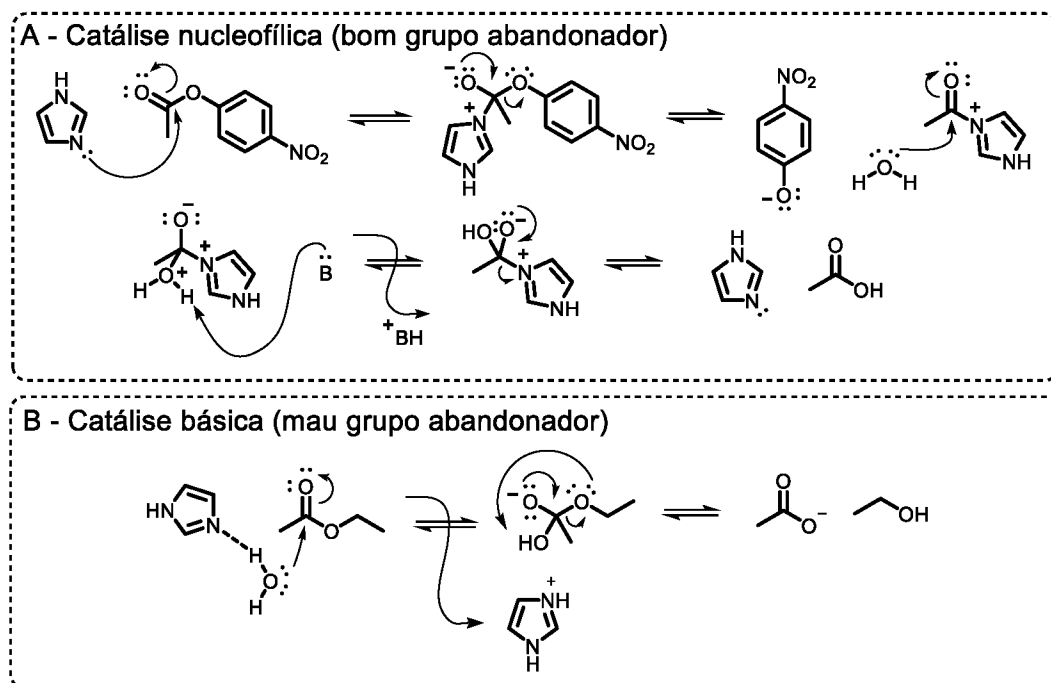


1.3.1 IMIDAZOL COMO CATALISADOR

O IMZ é um conhecido catalisador em síntese orgânica utilizado em reações de silação de álcoois, ácidos carboxílicos e aminas e de transferência do grupo acila.²¹ O estudo das propriedades catalíticas do IMZ é bastante amplo, principalmente devido a necessidade de compreensão da sua atuação no meio biológico. Dessa forma existem diversos trabalhos que tem como foco as reações catalisadas por moléculas de IMZ.

Para reações de transferência do grupo acila, estudos mostram que os mecanismos de catálise pelo IMZ dependem de fatores como a ativação do centro eletrofílico e da natureza dos grupos abandonadores. A reação do IMZ com ésteres carboxílicos que apresentam bons grupos abandonadores (*i.e.* grupos de saída que o ácido conjugado possui baixo pK_a , como *p*-nitrofenol, $pK_a = 7,1$) são, de forma geral, aceleradas por mecanismos de catálise nucleofílica.³⁹ Nesse caso, o mecanismo mais aceito envolve o ataque do IMZ no carbono da carboxila formando um intermediário tetraédrico, seguido do colapso deste intermediário e formação do segundo intermediário acilimidazol, que é rapidamente hidrolisado, formando o ácido correspondente e regenerando o IMZ, conforme mostrado no Figura 13 (A).³⁹ Quando os grupos abandonadores são fracos (*i.e.* que possuem elevado pK_a , como etanol, $pK_a = 15,8$) o IMZ atua preferencialmente como catalisador básico geral onde ele assiste uma molécula de água através da abstração de um próton (Figura 13 B).³⁹

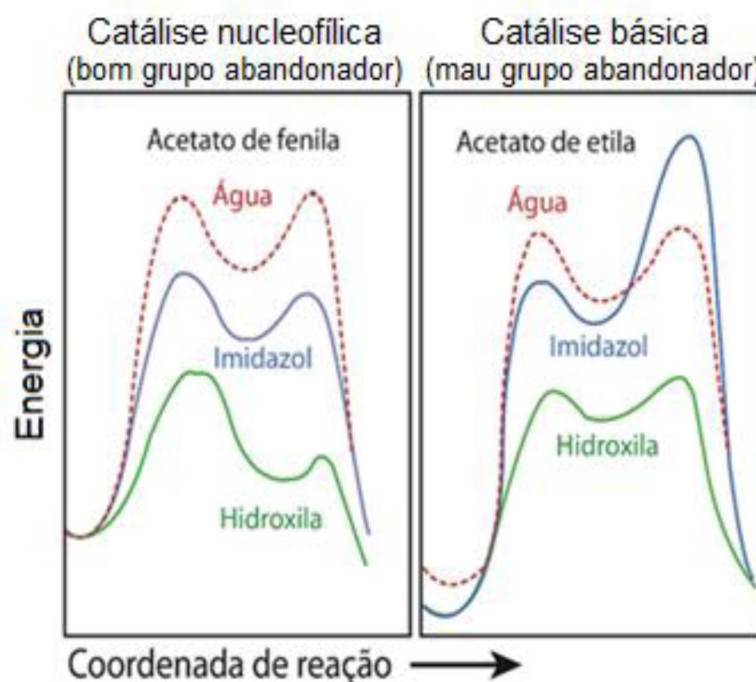
FIGURA 13 - MECANISMO DA REAÇÃO ENTRE IMZ E ACETATO DE p-NITROFENILA EM MEIO AQUOSO



A diferenciação do mecanismo apontada acima é explicado por Jencks e Carrioulo com base na barreira de energia enfrentada no caso de catálise básica *versus* catálise nucleofílica.⁴⁰ O gráfico da Figura 14 mostra as coordenadas de reação para os dois tipos de catálise com substratos com bom (acetato de fenila) e mau grupo (acetato de etila) abandonador. O mecanismo de adição seguido de eliminação passa por um intermediário tetraédrico, que ao regenerar a ligação dupla do oxigênio da carbonila expulsa a base mais fraca. Quando o éster possui um bom grupo abandonador, esse também é a base mais fraca e é facilmente expulso. Por outro lado, quando se trata de um mau grupo abandonador, a base mais fraca se torna o próprio IMZ, assim o colapso do intermediário tetraédrico leva ao material de partida. Dessa maneira, se torna fácil compreender por que a catálise básica é mais efetiva em substratos com maus grupos de saída. Esse fato se expressa na alta energia requerida para a expulsão de uma base forte.

Como esperado, os substituintes também afetam a reatividade dos derivados de imidazol, de forma geral, relacionados a alguns fatores (i) variação do pK_{aH} do nitrogênio uma vez que esse é o centro responsável pela catálise ácida, básica ou nucleofílica, (ii) impedimento estérico imposto por esses substituintes (sobretudo na posição 2) e (iii) substituintes capazes de fazer ligações de hidrogênio que permitem catálise intramolecular, como observado nas enzimas.⁴¹

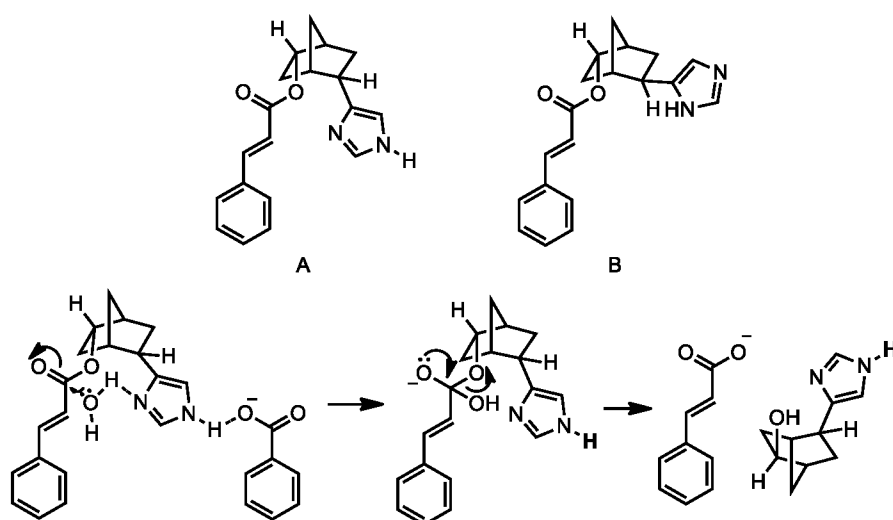
FIGURA 14 - COORDENADA DE REAÇÃO PARA CATÁLISE BÁSICA E NUCLEOFÍLICA DE ÉSTERES CARBOXÍLICOS PELO IMZ



No sentido de buscar compreender esse último efeito, algumas moléculas com esse potencial já foram sintetizadas. Takeda e colaboradores sintetizaram duas moléculas contendo grupamentos IMZ próximos a um grupo carboxila, Figura 15.⁴² O estudo avaliou o efeito do solvente e a adição de ácido benzoico, buscando compreender a interação do grupamento ácido carboxílico e o IMZ, uma vez que é recorrente essa interação nos sítios enzimáticos. Os resultados obtidos mostraram que (i) o IMZ atua como catalisador básico, assistindo uma molécula de água no ataque sobre a carboxila do éster (ii) que a adição de ácido benzoico no meio reacional aumenta a velocidade de reação linearmente com a concentração de ácido adicionado e (iii) a molécula A é mais reativa que a molécula B, com o efeito da adição do ácido na constante de velocidade estando apenas entre 7 a 12% para a molécula B em relação a A. Isto é, a proximidade do IMZ aumenta drasticamente a reatividade.

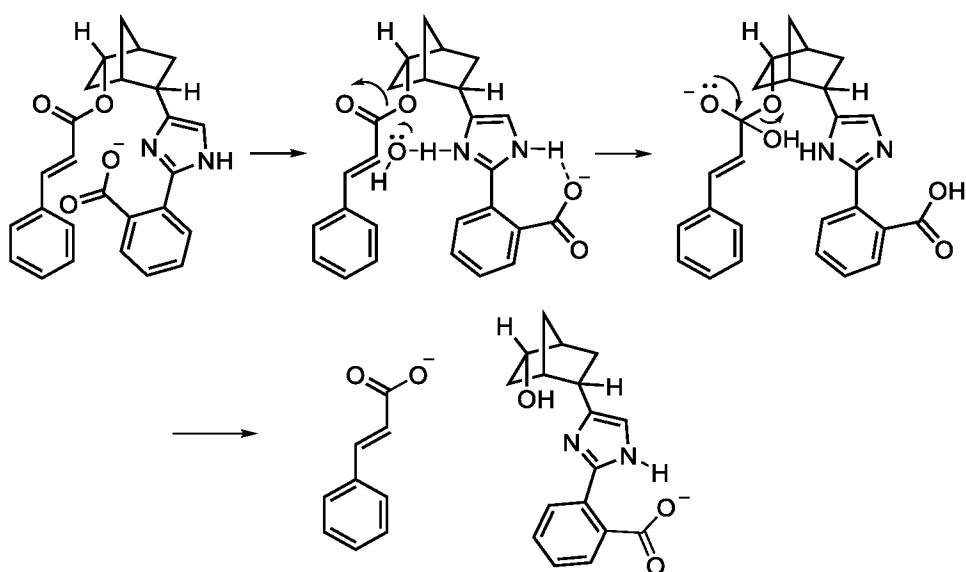
Como continuação desses estudos Bender e colaboradores, sintetizaram uma molécula semelhante, onde o grupamento carboxilato estava ligado diretamente ao IMZ podendo assim atuar como catalisador intramolecular, Figura 16.⁴³

FIGURA 15 - MODELOS INTRAMOLECULARES CONTENDO IMIDAZOL



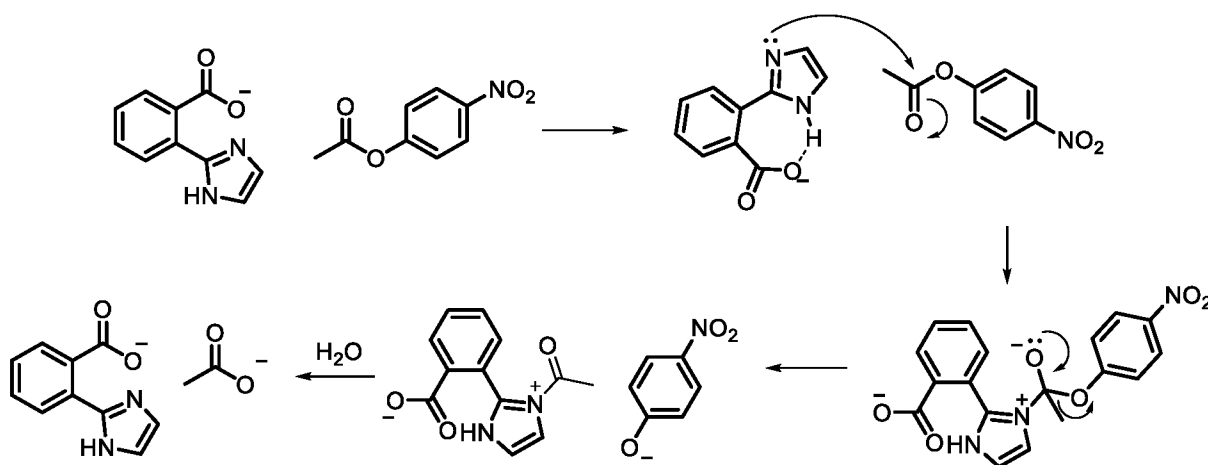
Os resultados obtidos para a molécula apresentada na Figura 16 mostraram uma constante de velocidade 154.000 vezes maior em relação a reação com a molécula A.⁴³ Ainda, a hidrólise da molécula modelo foi apenas 18 vezes mais lenta que as reações da α -quimotripsina com cinamatos. Esse fato mostra que o sistema consegue não apenas mimetizar a atividade enzimática como serve como um bom modelo para estudar a forma a qual as enzimas catalisam reações.

FIGURA 16 - MODELO INTRAMOLECULAR CONTENDO IMIDAZOL E ÁCIDO CARBOXÍLICO



Bowden e Brownhill estudaram um sistema onde a carboxila a ser atacada não estava ligada quimicamente a mesma estrutura onde estava o nucleofílo.⁴⁴ O mecanismo proposto para a reação do modelo 2(*o*-carboxifenil)imidazol com o acetato de *p*-nitrofenila está apresentado na Figura 17. Nele está combinada a catalise básica intramolecular combinada com catálise nucleofílica, sendo a reação praticamente 2 vezes mais rápida devido a presença do grupo carboxilato.

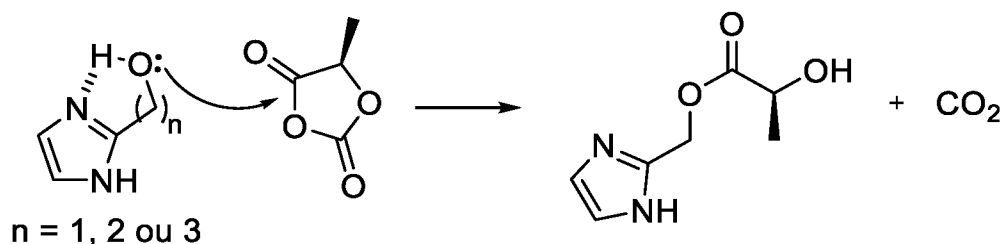
FIGURA 17 - MECANISMO DE CATÁLISE BÁSICA INTRAMOLECULAR COMBINADA COM CATÁLISE NUCLEOFÍLICA



1.3.2 HIDROXIIMIDAZOIS

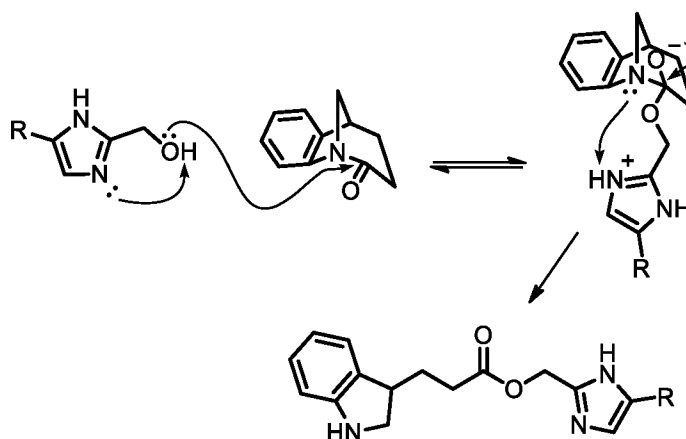
Uma classe de derivados de IMZ que merece atenção são os hidroxiiimidazois. Dependendo da posição da hidroxila, essas moléculas podem fazer ligações de hidrogênio intramoleculares, afetando diretamente a reatividade do composto, assim como ocorre para os derivados de IMZ com grupamentos carboxila, discutidos na seção anterior. Em um estudo de Leclaire e colaboradores,⁴⁵ avaliou-se a reatividade de hidroxiiimidazois, variando o tamanho da cadeia alifática, frente a uma reação modelo, onde o hidroximidazol reage com um composto carbonilado, gerando um produto de acilação (Figura 18). Os resultados apontaram que a ligação de hidrogênio N-H-O favoreceu um mecanismo de catálise básica intramolecular. Nesse caso o nitrogênio imínico do IMZ assiste a porção alcoólica da molécula promovendo um ataque nucleofílico do oxigênio sobre a carboxila (Figura 18) formando um éster.

FIGURA 18 - REAÇÃO DE HIDROXIIMIDAZÓIS VIA ATAQUE NUCLEOFÍLICO DO OXIGÊNIO



Em outro estudo, Skorey e colaboradores sintetizaram uma série de 2-hidroximetil(imidazóis) com e sem substituintes metila nas posições 4 e 5 do anel e avaliaram a reatividade desses compostos frente a uma lactama, sendo observados produtos de O-acilação.⁴⁶ Nesse caso, os autores propõem um mecanismo de catalise básica intramolecular, facilitando o ataque da porção alcoólica sobre o carbono da lactama, seguido de uma catálise ácida auxiliando o colapso do intermediário tetraédrico através da protonação do nitrogênio Figura 19.

FIGURA 19 - REAÇÕES DE 2-HIDROXIIMIDAZOIS COM UMA LACTAMA MODELO



De maneira geral, observa-se que o grupamento IMZ é fundamental em diversos processos de desacilação e também de desfosforilação, justificando o desenvolvimento de derivados de IMZ com propriedades adicionais, *e.g.* catálise intramolecular pelo grupo vizinho. De fato, o grupo IMZ promove muitas reações biológicas de desfosforilação em diversos sítios enzimáticos, portanto a sua forma de atuação com organofosforados tem sido alvo de muitos estudos.

1.4 COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS

Organofosforados são compostos orgânicos que apresentam átomos de fósforo em sua estrutura. Dentre os vários tipos de organofosforados conhecidos, uma classe de grande interesse são os ésteres de fosfato. Os ésteres de fosfato podem ser vistos como derivados do ácido fosfórico, onde grupamentos orgânicos (alquílicos ou arílicos) estão ligados diretamente aos átomos de oxigênio. Essas estruturas podem ser classificadas como mono, di ou triésteres de acordo com o grau de substituição, como mostrado na Figura 20. Eles são altamente estáveis, ou seja, a clivagem da ligação P-O é desfavorecida e pode levar anos para acontecer. Por exemplo, o tempo de meia-vida para a hidrólise do fosfato de metila, à temperatura ambiente, é estimada em 477 mil anos.⁴⁷

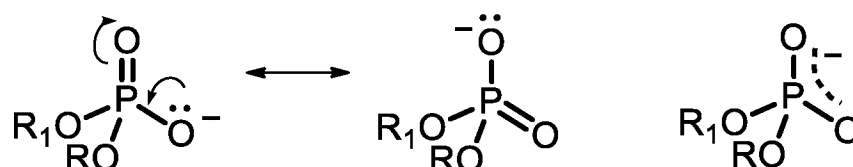
FIGURA 20 - MONO, DI E TRIÉSTERES, RESPECTIVAMENTE ONDE R_{1,2,3} REPRESENTAM SUBSTITUÍNTES



Em organismos vivos, os organofosforados são encontrados como mono e diésteres sendo os triésteres apenas sintéticos. Os mono e diésteres estão presentes em moléculas essenciais para a vida, como nucleotídeos que são a base do DNA e RNA, armazenamento de energia (ATP, ADP) entre outros.^{48,49} Processos de transferência do grupo fosforila são responsáveis pela transmissão da informação genética, biossíntese, bem como por processos regulatórios e de sinalização celular. Estima-se que existem, no corpo humano, cem mil sítios passíveis de fosforilação e que 1/3 de todas as proteínas das células são fosforiladas pelo menos uma vez.⁵⁰ Dentre os processos de fosforilação, as fosfohistidinas chamam a atenção, sendo um componente crítico nos processos de sinalização celular em seres procariontes. No caso dos seres eucariontes aproximadamente 6% dos processos de fosforilação são baseados em fosfohistidinas.⁵¹ Ainda, a interação com os grupamentos vizinhos no ambiente celular pode aumentar a estabilidade das fosfohistidinas através de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Esse fato instiga o estudo da

interação entre os anéis de IMZ com diésteres de fosfato uma vez que a transferência do grupo fosforila em diversos casos ocorre através do anel de IMZ fosforilado. O caráter ácido dos mono e diésteres fosfóricos, em pH fisiológico, permite que, por um lado, esses componentes se mantenham ionizados impedindo de passar pela membrana lipídica. Por outro lado, aumentam a estabilidade, pois a carga negativa localizada no oxigênio inibe ataques nucleofílicos aos átomos de fósforo, além de tornar o fósforo menos eletrofílico devido à dispersão da carga sobre a estrutura (Figura 21).^{50,52}

FIGURA 21 - CARGA NEGATIVA EM DIESTERES DE FOSFATO; ESTABILIZAÇÃO DO FÓSFORO

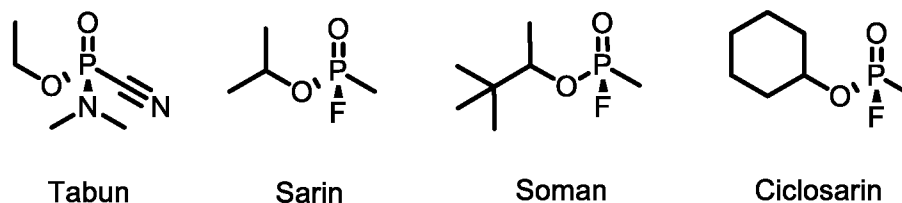


O fato dos compostos fosforilados presentes no organismo serem bastante estáveis faz com que os processos de fosforilação/desfosforilação sejam mediados por enzimas. Dessa forma, as quebras de ligações fósforo-oxigênio que levariam milhares de anos para ocorrerem em condições normais, ocorrem em poucos segundos e sem a necessidade de altas temperaturas e condições drásticas. Dentre as enzimas conhecidas por participarem desses processos estão as RNases, ATPases, DNA polimerases, entre outras.⁵⁰

Os organofosforados não encontrados na natureza são acessíveis via rotas sintéticas, destacando-se os triésteres. O primeiro composto organofosforado sintetizado foi o pirofosfato de tetraetila (1854).⁵³ Entretanto, foi apenas nos anos 1930 que a síntese de organofosforados começou a receber atenção especial. Em 1932, Lange e Kruger ao sintetizarem o fosfofluridrato de dietila e de dimetila descreveram que a inalação desses produtos causava visão borrada e sufocamento.⁵³ Esse fato chamou a atenção sobre a toxicidade dos organofosforados e já em 1936 houve a síntese da parationa com o objetivo de usá-la nas lavouras, como pesticida. Como nessa época estava iminente o início da 2ª guerra mundial, utilizou-se esse conhecimento para o desenvolvimento de armas químicas. Os alemães sintetizaram uma série de compostos (tabun, sarin, soman e ciclosarin) que ficou conhecida como série G (Figura 22) e posteriormente os

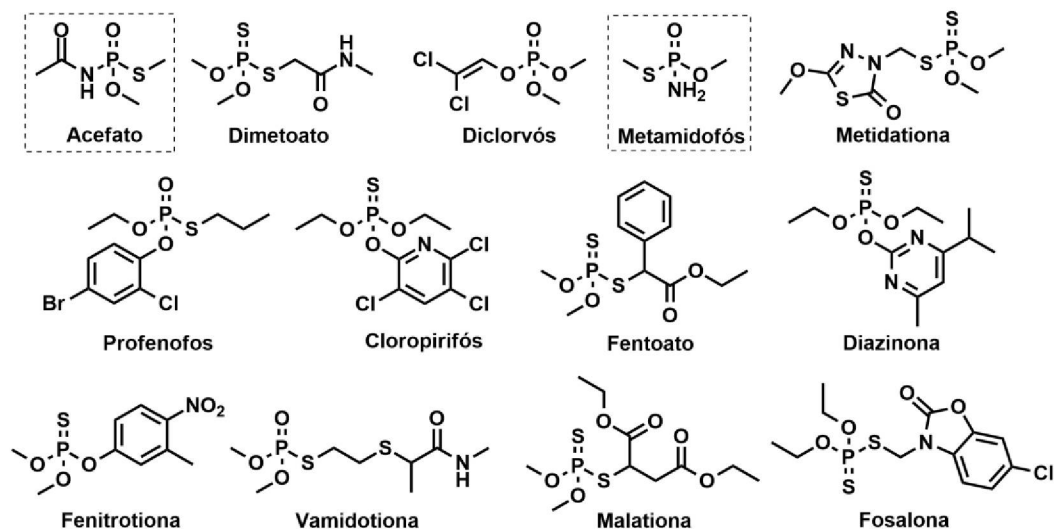
ingleses e os soviéticos também fizeram a síntese de organofosforados que ficaram conhecidas como série VX e VR, respectivamente.⁵⁴

FIGURA 22 - ORGANOFOFORADOS DA SÉRIE G



Atualmente os organofosforados tem ampla aplicação na agricultura sendo que existem dezenas de produtos com princípios ativos variados que são comercializados. Esses compostos têm alta resistência a degradação e variam seus graus de toxicidade, sendo de forma geral tóxicos ao ser humano mesmo em baixas quantidades. No relatório da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) do Programa para Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com dados referentes ao ano de 2012, aproximadamente 29% das amostras de alimentos coletadas apresentaram limites de agrotóxicos maiores que o limite máximo permitido, uso de agrotóxico não autorizado para determinada cultura ou a presença de compostos que são proibidos no Brasil. Ainda, dentro das 71% restantes, que foram consideradas satisfatórias, praticamente em metade delas também houve a detecção de resíduos de agrotóxicos.⁵⁵ Ainda, segundo o relatório, a maioria das irregularidades envolvem pesticidas organofosforados. Dos compostos irregulares (proibidos ou utilizados sem autorização para determinada cultura) detectados, 13 são organofosforados. Suas estruturas são mostradas na Figura 23.

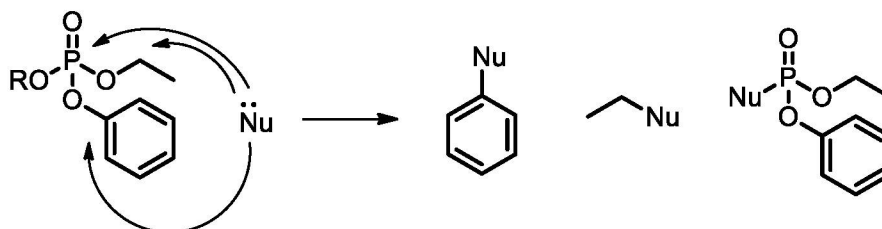
FIGURA 23 - ORGANOFOSFORADOS EM PROCESSO DE DESCONTINUIDADE E BANIMENTO (TRACEJADO) OU COM USO NÃO AUTORIZADO ENCONTRADOS EM AMOSTRA DE ALIMENTOS



1.4.1 Reações com organofosforados

Os ésteres de fosfato apresentam reatividade dependente de diversos fatores como substituintes, solventes, nucleófilos etc. Eles de forma geral atuam como eletrófilos, podendo ser atacados por nucleófilos em diversos centros como o fósforo, carbonos alifáticos e carbonos aromáticos, Figura 24. De forma geral em condições de pH alcalinas o ataque ocorre no átomo de fósforo central e em condições de pH ácido o ataque ocorre no carbono alifático.⁵⁶

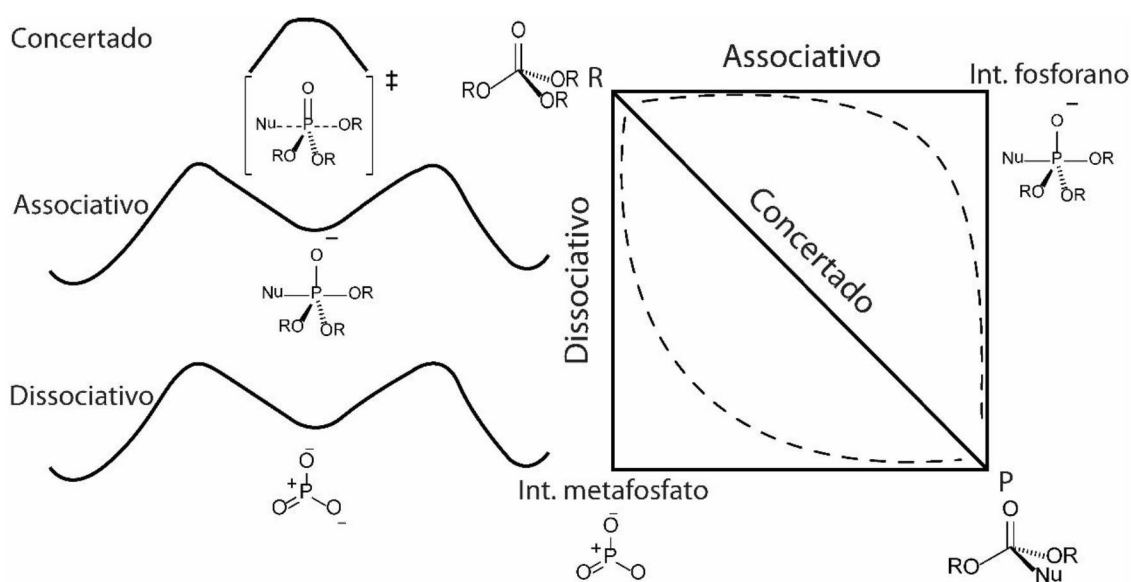
FIGURA 24 - POSSÍVEIS ATAQUES NUCLEOFÍLICOS EM UM ÉSTER DE FOSFATO



Nas reações de hidrólise, resumidamente, eles seguem a seguinte escala de reatividade triéster>diéster>monoéster. De forma geral, os triésteres e diésteres reagem de acordo com mecanismos associativos e concertados, enquanto os monoésteres seguem um caminho dissociativo, similares aos da química do carbono.⁵⁷ No mecanismo concertado, o nucleófilo ataca o átomo central de fósforo formando um estado de transição pentacoordenado, sendo então o ataque e a saída

do grupo abandonador concomitantes. No mecanismo associativo do tipo adição-eliminação, o ataque do nucleófilo sobre o átomo de fósforo ocorre com o deslocamento do par eletrônico da ligação dupla oxigênio fósforo formando um intermediário pentacoordenado. O colapso do intermediário, a partir da restauração da ligação dupla oxigênio-fósforo expulsa o grupo abandonador. Já o mecanismo dissociativo ocorre a partir da saída do grupo abandonador e a formação do íon metafosfato, com essa espécie, carregada positivamente, sendo atacada pelo nucleófilo (Figura 25).⁵⁷

FIGURA 25 - CAMINHOS REACIONAIS PARA ÉSTERES DE FOSFATO

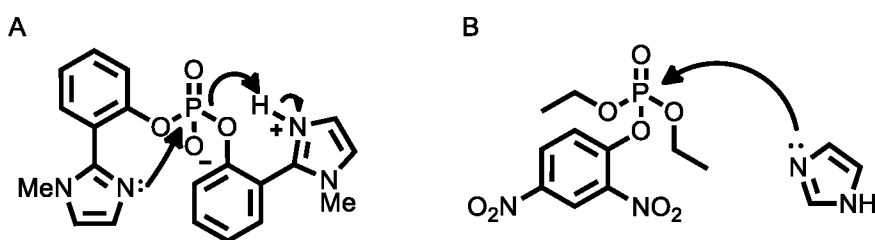


Entretanto, esses mecanismos ainda podem variar de acordo com a natureza dos nucleófilos, solvente, substituintes, se apresentando de forma mista, como, por exemplo, sendo concertado de caráter associativo. Nesse caso, a quebra da ligação P-O do grupo abandonador está “adiantada” em relação a formação da ligação nucleófilo fósforo, em outras palavras, a entrada do nucleófilo e saída do grupo abandonador não são sincronizadas.

Um dos interesses da química dos ésteres de fosfato é a compreensão da quebra das ligações fósforo oxigênio, uma vez que essas, de forma geral, são resistentes a clivagem. Nesse sentido vários sistemas já foram estudados com o propósito de acelerar essa quebra, como meios micelares,^{58,59} complexos metálicos,^{60,61} espécies radiculares⁶² etc. O interesse na compreensão da reatividade desses compostos está fortemente ligada a atividade enzimática e o

desenvolvimento de sistemas que sejam capazes de mimetiza-las. Moléculas contendo grupamentos imidazólicos e fosfatos (Figura 26) já foram estudados buscando a compreensão de como a catálise intramolecular pode acelerar a quebra das ligações P-O. Essas moléculas se mostraram interessantes modelos minimalistas de como comportam-se os sítios enzimáticos, com incrementos catalíticos próximos a 10^6 vezes.⁶³⁻⁶⁵

FIGURA 26 - REAÇÕES COM ÉSTERES DE FOSFATO INTRA E INTERMOLECULARES



Estudos de sistemas catalíticos em reações com ésteres de fosfato foram capazes de mensurar a contribuição da reatividade relacionada aos nucleófilos e grupos abandonadores através das RLEL, por exemplo, relação de Bronsted e Hammet.^{66,67} Todavia mais estudos são necessários para melhor entendimento da reatividade apresentada por esses compostos de maneira geral a fim de não só compreender os mecanismos enzimáticos, mas também para desenvolver enzimas artificiais e ainda promover processos eficazes para detoxificação de agentes tóxicos como armas químicas ou pesticidas.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os elementos discutidos na introdução sobre o IMZ e seus derivados, bem como a problemática envolvendo os compostos organofosforados, o estudo cinético e mecanismo dessa classe de reações é bastante útil. Nesse contexto, o presente estudo busca contribuir para o entendimento da reatividade dos organofosforados nas diversas formas que se apresentam, como o meio biológico (diésteres) e os pesticidas (triésteres). Catalisadores derivados de IMZ são promissores pois possuem alta reatividade em condições amenas (meio neutro) e são multifuncionais pois podem exercer múltiplas catálises. Nesse projeto buscou-se compreender a reatividade do IMZ com mudança do seu substituinte a fim de otimizar a catálise e permear o desenvolvimento de novos materiais derivados de IMZ com propriedades aprimoradas. Muitos estudos catalíticos estão relatados na literatura que envolvem o IMZ e seu derivado histidina, mas ainda não há um estudo sistemático relacionando a estrutura do nucleófilo derivado de IMZ e o organofosforado. Assim, o foco principal é avaliar mudanças na estrutura do IMZ, variando seu substituinte, na sua atividade catalítica com organofosforados. Por fim, pretendemos variar a estrutura do organofosforado (di- e triéster) para elucidar seus mecanismos, visto que é conhecido que organofosforados com diferentes reatividades podem reagir por mecanismos diferentes.

3 OBJETIVOS

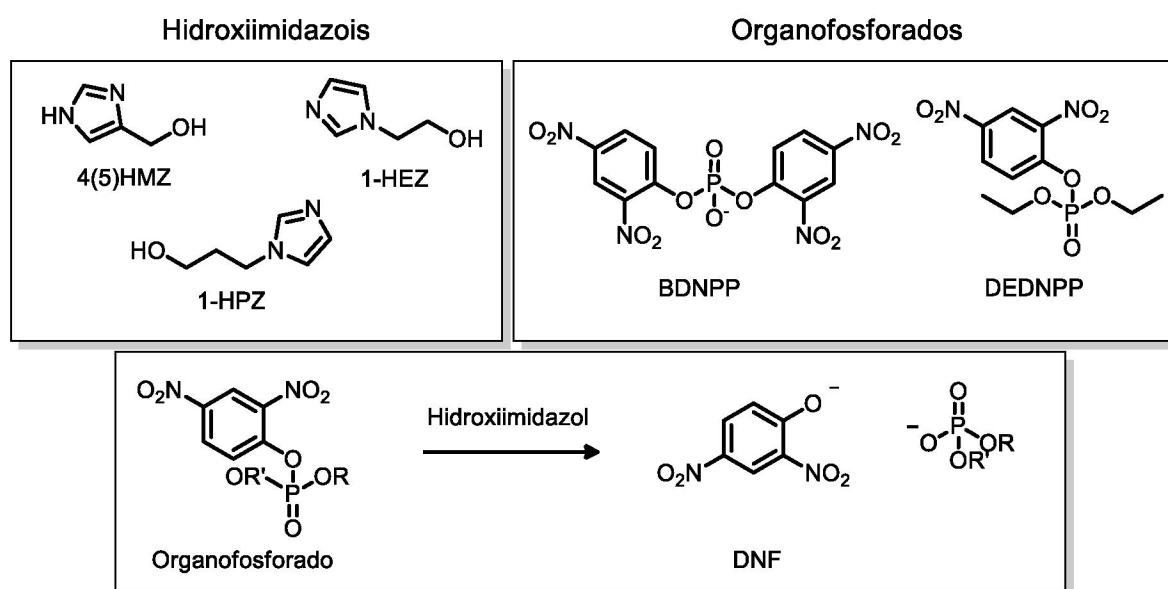
3.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é sintetizar hidroximidazóis e avaliar sua reatividade na reação com organofosforados.

3.1.2 Objetivos Específicos

- I. Síntese dos hidroximidazóis: 1-(2-Hidroxietil)imidazol (1-HEZ) e 1-(3-Hidroxipropil)imidazol (1-HPZ).
- II. Síntese do éster de fosfato dietil 2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP).
- III. Caracterização dos hidroximidazóis por RMN, infravermelho (IV) e ponto de fusão.
- IV. Estudo cinético das reações dos derivados sintetizados com os organofosforados DEDNPP e bis-2,4 dinitrofenil fosfato de sódio (BDNPP) utilizando a técnica de espectroscopia UV-vis. Estudo cinético das reações com o derivado comercial 4(5)(Hidroximetil)imidazol 4(5)HMZ com o organofosforado BDNPP.
- V. Elucidação mecanística das reações por espectrometria de massas (EM) e RMN (^{31}P , ^{13}C e ^1H).

FIGURA 27 - COMPOSTOS AVALIADOS NESSE TRABALHO



4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados para as sínteses e estudos cinéticos foram: BDNPP (obtido com colaboradores), deuteróxido de sódio (Aldrich), cloreto de deutério (Aldrich), 4(5) hidroximetil(imidazol) (4(5)HMZ) (Sigma), imidazol (Sigma-aldrich), 2-cloroetanol (Merck), 3-cloropropanol (Sigma-aldrich), ácido clorídrico (Dinâmica), hidróxido de sódio (Vetec), hidróxido de potássio (Vetec), anidrido benzoico (Merck), cloreto de trimetil benzilamônio (merck), acetonitrila (Carlo-Erba), 2,4-dinitrofenol (Merck), benzeno (Sigma-aldrich), clorofosfato de dietila (Sigma-aldrich), metanol (Dinâmica) e trietilamina (Sigma-aldrich). Os demais solventes como etanol, tetraidrofurano e diclorometano foram destilados previamente.

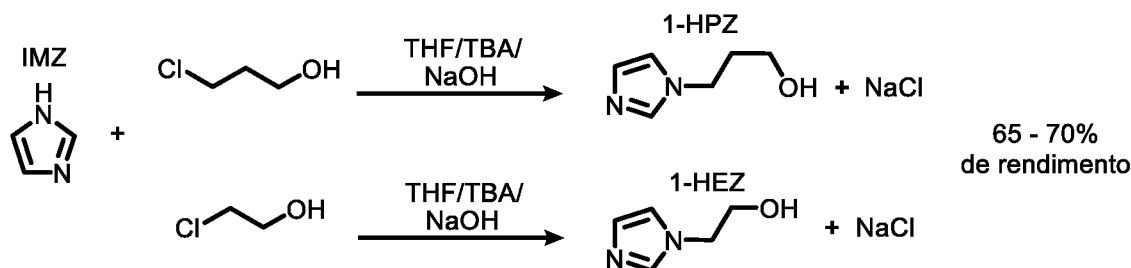
4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE IMIDAZOL

Para a síntese e purificação dos hidroxiiimidazóis 1-HEZ e 1-HPZ foram utilizadas duas rotas reacionais A e B, que serão descritas a seguir.

Rota A: O 1-HPZ (Figura 28) foi sintetizado de acordo com metodologia adaptada,⁶⁸ descrita a seguir. Em um balão com junta esmerilhada contendo 5 mL de tetraidrofurano (THF) anidro foram adicionados imidazol (5 mmol; 340 mg), 3-cloropropanol (5 mmol; 416 µL) e hidróxido de sódio (5 mmol; 199 mg). A seguir foi adicionado cloreto de trimetilbenzilamônio (TBA) (0,16 mmol; 29 mg). O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo a 80°C durante 7 dias. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (hexano/acetato de etila/metanol 0,55/0,35/0,1), eluído duas vezes, utilizando iodo molecular como revelador. Após o resfriamento da solução, o NaCl formado foi filtrado e o sólido lavado com THF. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, e o produto bruto foi aplicado em sílica *flash* (fase móvel diclorometano/metanol 9:1) para remoção do TBA. O IMZ restante foi removido por sublimação a 90°C sob pressão reduzida. O rendimento obtido foi de 65 % em relação ao IMZ.

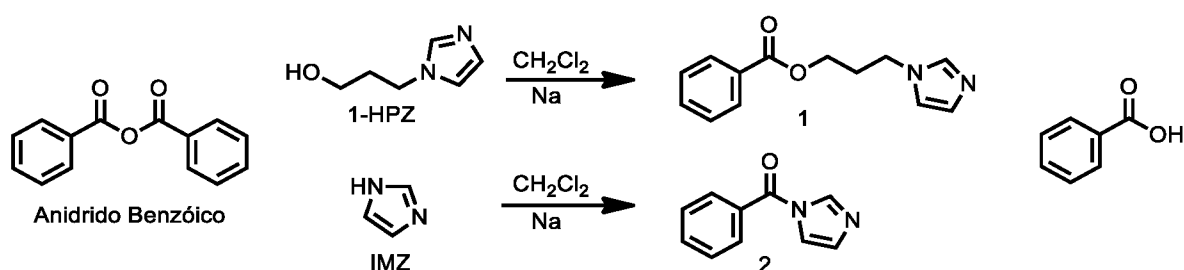
Para a síntese do 1-HEZ foi adotado o procedimento supradescrito sendo substituído o precursor alcoólico de 3-cloropropanol para 2-cloroetanol. O rendimento obtido foi de 70% em relação ao IMZ.

FIGURA 28 - SÍNTESE DOS HIDROXIIMIDAZOIS 1-HPZ E 1-HEZ



A outra rota adotada está descrita a seguir, rota B: O bruto das reações do 1-HPZ e 1-HEZ com os alcoois 3-cloropropanol e 2-cloroetanol foram tratados como segue. O produto da reação na escala de 10 mmol do 1-HPZ foi solubilizado em 10 mL de diclorometano, sendo em seguida, adicionado anidrido benzoico (10 mmol; 2,26 g). Sob agitação magnética, uma pequena porção de sódio (alguns miligramas) foi adicionada, sendo rapidamente consumido (Figura 29). A reação foi mantida sob agitação magnética, sendo acompanhado o consumo dos materiais de partida IMZ e 1-HPZ e a formação dos produtos 1 e 2 por CCD, sílica impregnada com revelador UV (254 nm) utilizando fase móvel 9:1 diclorometano/metanol. Após o consumo total dos materiais de partida, os produtos da reação foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O produto foi aplicado em sílica *flash* e cromatografado com fase móvel 9:1 diclorometano/metanol. As frações contendo o produto 1 foram isoladas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

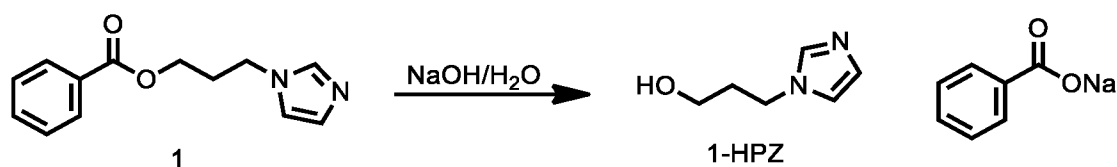
FIGURA 29 - DERIVATIZAÇÃO DO 1-HPZ E IMZ COM ANIDRIDO BENZOICO



Ao balão contendo o produto 1, foi adicionado 10 mL de água destilada e hidróxido de sódio (20 mmol; 0,798 mg), havendo a formação de duas fases, e mantido sob agitação magnética (Figura 30). O meio reacional foi mantido sob

agitação até a homogeneização do mesmo (24 horas). O meio reacional foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e aquecimento (50 °C); ao produto obtido foi adicionado 10 mL de diclorometano, agitado e em seguida filtrado a vácuo, o semi-sólido foi lavado com mais duas porções de diclorometano (10 mL cada). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, obtendo-se o 1-HPZ com rendimento de 54% em relação ao imidazol de partida. Ao produto da reação do 1-HEZ foi aplicado metodologia semelhante sendo obtido o composto com rendimento de 60%.

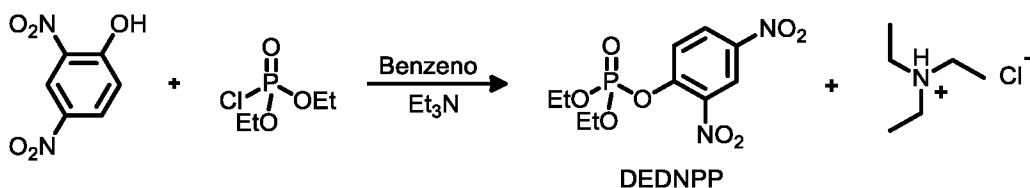
FIGURA 30 - HIDRÓLISE ALCALINA DO COMPOSTO 1



4.3 SÍNTESE DO DEDNPP

Para a síntese do DEDNPP (Figura 31) foi utilizado o procedimento descrito a seguir.⁵⁸ Foram solubilizados 5 mmol (862 mg) de clorofosfato de dietila e 5 mmol (920 mg) de 2,4-dinitrofenol em benzeno, seguido da adição de 5,5 mmol (0,696 mL) de trietilamina. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo por 8 horas. O cloreto de trietil amônio formado foi extraído com água e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 . Posteriormente, o produto foi concentrado evaporando o solvente sob pressão reduzida. O rendimento da reação foi de 78% em relação ao clorofosfato de dietila.

FIGURA 31 - SÍNTESE DO DEDNPP



4.4 CARACTERIZAÇÃO

Os espectros de infravermelho foram adquiridos no equipamento Bio-Rad, utilizando pastilha de KBr na região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}). Os espectros dos compostos por RMN foram adquiridos no espectrômetro Bruker DPX200 operando em 200 MHz para ^1H , 50 MHz para ^{13}C e 80 MHz para ^{31}P . Os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H apresentados são em relação ao padrão tetrametilsilano (0 ppm) e os de ^{31}P em relação ao padrão H_3PO_4 (85% m/m) em D_2O (0 ppm). As análises de EM foram realizadas em espectrômetro de captura de íons (LTQ-XL) com ionização por *electrospray* (ESI), sendo realizadas no modo positivo e negativo com as espécies selecionadas sendo dissociadas por colisão induzida (ESI-MS/MS, CID). As análises de ponto de fusão foram executas no equipamento de ponto de fusão digital MP90 METTLER TOLEDO com rampa de $1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A determinação dos pK_{aH} dos derivados de IMZ foram feitas a partir de titulação potenciométrica, solubilizando 1 mmol do composto em água ultrapura ($18\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$), livre de CO_2 , em cela com banho termostatizado ($25\text{ }^\circ\text{C}$) e KOH padronizado. Os dados de volume de base adicionado *versus* pH foram ajustados com o *software* BEST7.⁶⁹

4.5 ACOMPANHAMENTO CINÉTICO

As reações dos compostos organofosforados com os hidroximidazois foram acompanhadas por espectroscopia UV-VIS pelo aparecimento do produto de reação 2,4 dinitrofenolato (DNF) que absorve em 400 nm, sob condições de pseudo primeira ordem (nucleófilo em excesso) e banho termostatizado. As soluções estoques dos organofosforados DEDNPP e BDNPP foram preparadas solubilizando os compostos em acetonitrila (concentração de $5 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ mantidas em freezer). A reação era iniciada com a adição de 10 μL da solução estoque do composto organofosforado em uma cubeta de quartzo (1 cm de caminho ótico) contendo uma solução com os hidroximidazois, onde variou-se o pH e a temperatura. As soluções dos hidroximidazois foram preparadas solubilizando o composto em água ultrapura ($18\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) e tendo seu pH ajustado com soluções de hidróxido de potássio (KOH) e ácido clorídrico (HCl), sem a utilização de tampões externos. Para as reações de efeito isotópico cinético, as soluções foram preparadas de forma semelhante, porém em solvente deuterado (D_2O) e o pD ajustado utilizando cloreto de deutério (DCI) ou

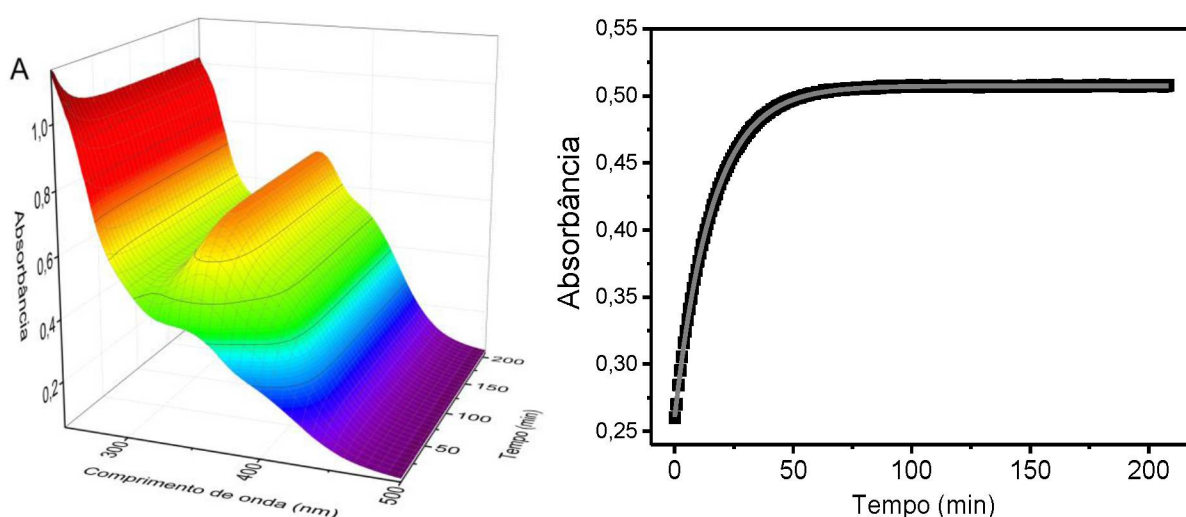
deuteróxido de sódio (NaOD). O pH foi convertido para pD utilizando a seguinte equação $\text{pH}_{\text{lido}} = \text{pD} + 0,4$.⁷⁰ Os valores de k_{obs} foram calculados a partir dos dados de absorbância *versus* tempo com a equação de velocidade de primeira ordem em relação aos produtos (Eq. 1) combinadas com a lei de Lambert-Beer, sendo obtida sua forma final (Eq. 2). Os perfis que não apresentaram o perfil típico de primeira ordem indicaram cinéticas mais complexas e as equações utilizadas estão discutidas com detalhes ao longo do texto. A Figura 32 (A) mostra espectros sucessivos tipicamente obtidos em relação ao tempo para a reação entre o 1-HPZ (0,1 mol/L) e DEDNPP a pH 8,97. A Figura 32 (B) apresenta o perfil cinético de pseudo-primeira ordem obtido em 400 nm que foi ajustado com a equação 2.

$$[\text{DNF}] = -[\text{DNF}]_{\infty}(e^{-k_{\text{obs}}t} - 1) \quad (1)$$

$$A_{\text{DNF } t} = A_0 + (1 + e^{-k_{\text{obs}}t})(A_i - A_0) \quad (2)$$

Onde $[\text{DNF}]$ = Concentração de DNF no tempo t , $[\text{DNF}]_{\infty}$ = Concentração de DNF com 100% de conversão, $A_{\text{DNF } t}$ = absorbância do DNF no tempo (t); A_0 = absorbância inicial; A_i = absorbância em com 100% de conversão; k_{obs} = constante de velocidade observada; t = tempo.

FIGURA 32 – (A) ESPECTROS SUCESSIVOS PARA A REAÇÃO DO 1-HPZ (0,1 mol L⁻¹; pH 8,97) COM DEDNPP E (B) AJUSTE DO PERFIL CINÉTICO TÍPICO (400 nm) COM A EQUAÇÃO 2



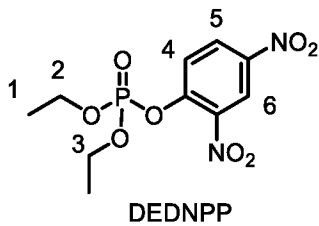
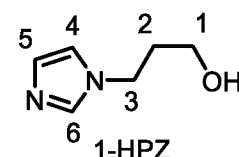
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

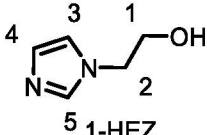
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos sintetizados foram caracterizados e estão de acordo com a literatura, conforme mostrado a seguir. As rotas A e B utilizadas para a síntese dos hidroximidazois se mostraram adequadas para obtenção dos compostos de interesse, entretanto, a rota A na etapa de sublimação se mostrou bastante sensível à intensidade do vacuo qual o processo era feito. Dessa forma, a metodologia foi adaptada para o uso da rota B, sendo os dados aqui apresentados referentes a essa rota. A

TABELA 3 3 apresenta um resumo de todas as caracterizações realizadas.

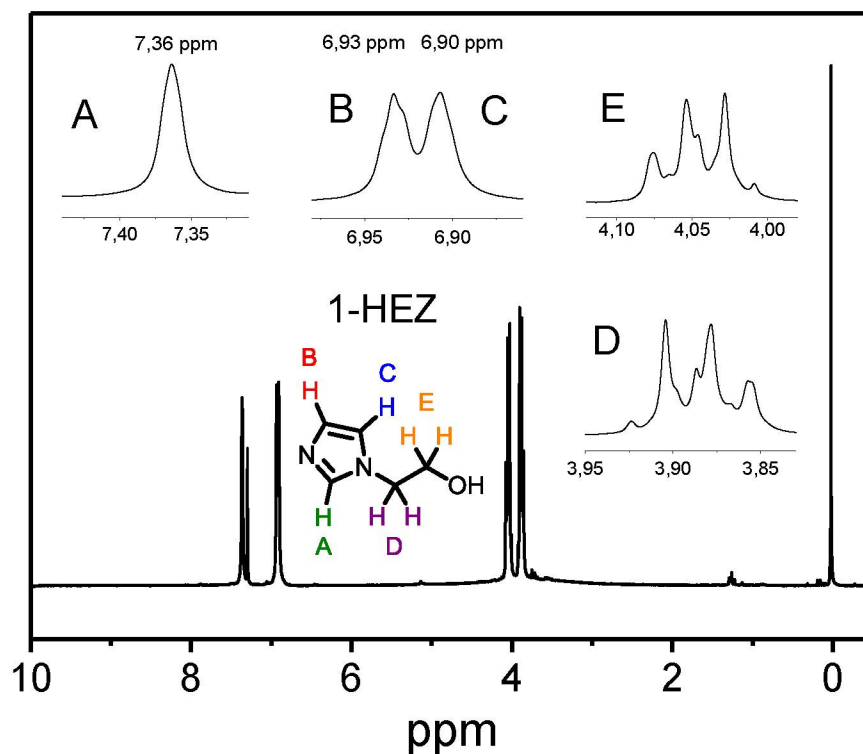
TABELA 3 – CARACTERISTICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

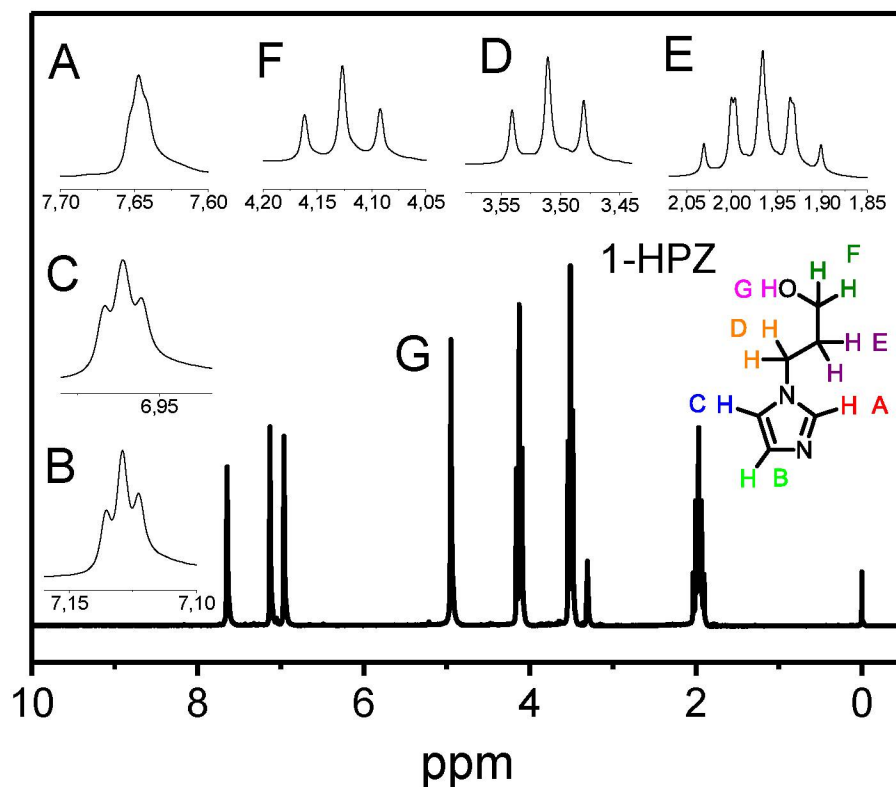
	Cor	Sólido amarelo
 <p>DEDNPP</p>		(1) 1,40 (dt, $J_1 = 7.08$, $J_2 = 1.08$, 6H), (2) 4,30 (dq $J_1 = 7.08$, $J_2 = 8.36$, 2H), (3) 4,31 (dq $J_1 = 7.08$, $J_2 = 8.46$, 2H), (4) 7,87 (dd, $J_1 = 9.15$ Hz; $J_2 = 0.54$ Hz 1H), (5) 8,46 (dd, $J_1 = 9.15$ Hz; $J_2 = 2.73$ Hz 1H) e (6) 8,80 (dd, $J_1 = 2.53$ Hz; $J_2 = 0.60$ Hz 1H) ^d
	δH (ppm) ^a	
	δC (ppm) ^a	16,6 (d, $J = 6.5$), 66,6 (d, $J = 6.3$ Hz), 122,2, 123,9, 129,4, 141,6 (d, $J = 7.75$ Hz), 144,2 e 148,8 (d, $J = 4.96$ Hz)
	δP (ppm)	-8,3 (q, $J_1 = 8.4$)
	Cor	Óleo amarelo
 <p>1-HPZ</p>		(2) 1,97 (tt, $J = 6.05$, $J = 7.03$ Hz 2H), (1) 3,51 (t, $J = 6.05$, 2H), (3) 4,12 (t, $J = 7.03$, 2H), (5) 6,93 (m, 1H), (4) 7,00 (m, 1H), (6) 7,45 (sl, 1H) ^e
	δH (ppm) ^g	
	δC (ppm) ^g	33,4, 43,5, 57,7, 119,0, 128,0 e 137,3 ^e
	Cor	Sólido amarelo cristalino
	Ponto de	37-38 ^b (37-39) ^f

	fusão (°C)	(2) 3,83-3,93 (m, 2H), (1) 3,97-4,11 (m, 2H),
	δH (ppm) ^a	(4) 6,90 (sl, 1H), (3) 6,93 (sl, 1H) e (5) 7,36 (sl, 1H).
	δC (ppm) ^a	50,0, 61,2, 119,4, 128,4, 137,2.
	^a (200 MHz, CDCl ₃ , TMS) ^b (50 MHz, CDCl ₃ , TMS) ^c ref ⁷¹ ^d determinado experimentalmente; ^e ref ⁷² ^f de acordo com a ref ⁷³ ^g de acordo com a ref ⁷⁴ ^h de acordo com ref ⁷⁵ ⁱ (200 MHz, MeOD, TMS)	

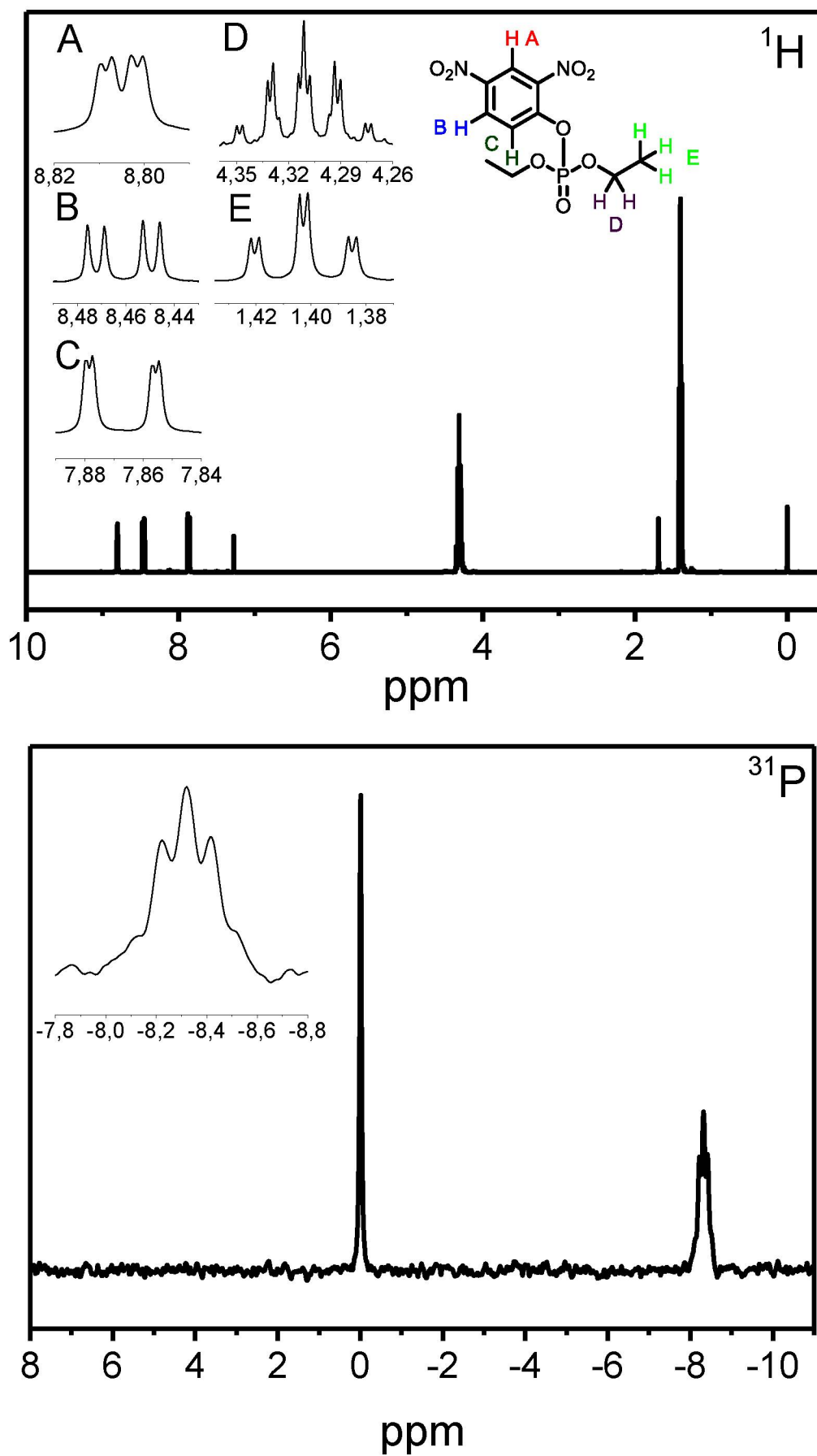
Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C apresentados pelos compostos 1-HEZ e 1-HPZ estão de acordo com os deslocamentos esperados.⁷⁴ Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos estão na região típica (6,5 e 8,0 ppm) e os sinais dos hidrogênios alifáticos se encontram em regiões de menor deslocamento químico (3,0 e 4,0 ppm). Os espectros de ^1H para o 1-HEZ e 1-HPZ estão apresentados na Figura 33.

FIGURA 33 - ESPECTROS DE RMN ^1H PARA O 1-HEZ E 1-HPZ



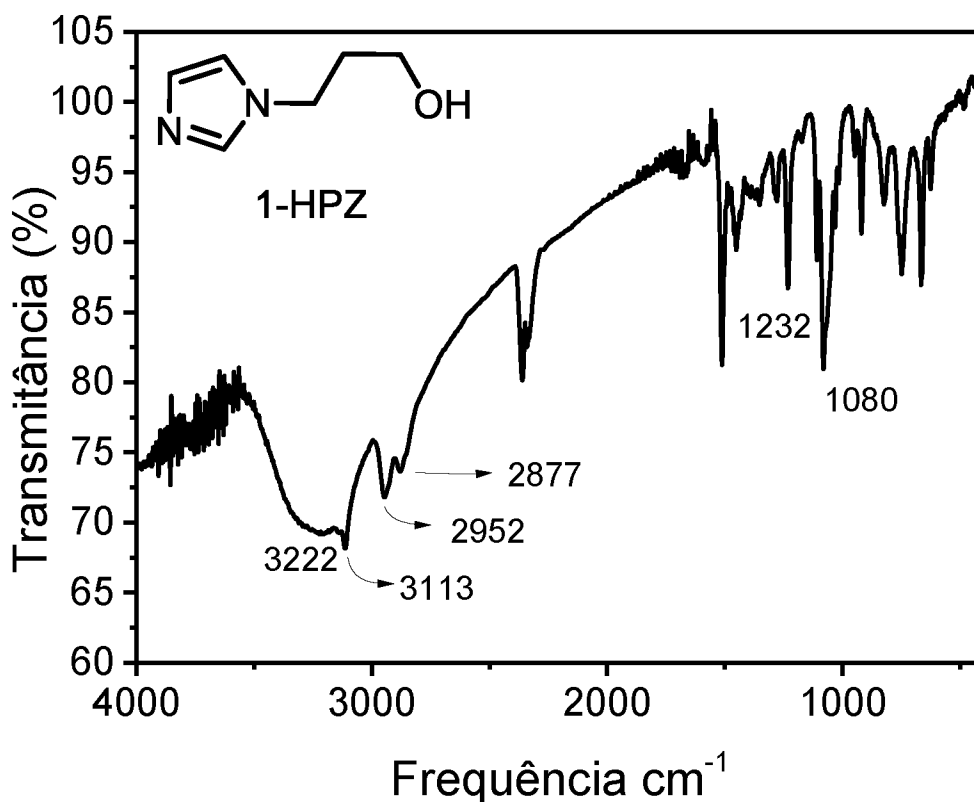


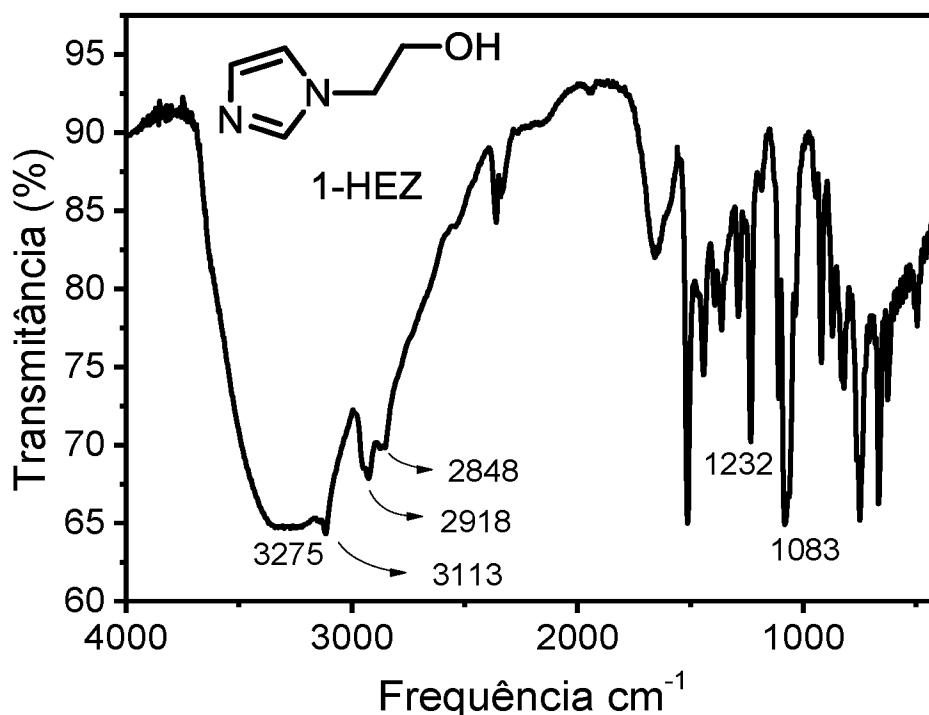
Para o DEDNPP os deslocamentos químicos observados estavam dentro da faixa de valores característica para hidrogênios aromáticos (7,0 e 9,0 ppm) e alifáticos (1,0 e 4,5 ppm).⁷³ Ainda, foi observado o acoplamento heteronuclear hidrogênio-fósforo para os hidrogênios alifáticos a três e quatro ligações de distância. A análise de RMN de ^{13}C do DEDNPP também evidenciou o acoplamento heteronuclear carbono-fósforo com os carbonos a duas e três ligações de distância. Os espectros de ^1H e ^{31}P estão apresentados na Figura 34. Os espectros de ^{13}C obtidos estão apresentados no apêndice 2.

FIGURA 34 - ESPECTROS DE ^1H E ^{31}P PARA O DEDNPP

Os espectros de infravermelho obtidos para as amostras dos hidroximidazois 1-HPZ e 1-HEZ apresentaram, como esperado, alta similaridade, uma vez que as estruturas químicas das duas moléculas se diferenciam, apenas, pelo tamanho da cadeia alifática ligada ao nitrogênio do IMZ. Na Figura 35 estão apresentados os espectros obtidos para os respectivos derivados, com destaque para as bandas de estiramento C-O (1232 e 1083 cm^{-1})⁶⁸ e para a banda larga referente ao estiramento da ligação oxigênio hidrogênio (3222 cm^{-1} ; 1-HPZ) e (3275 cm^{-1} ; 1-HEZ), típica de álcoois, que evidencia a principal mudança entre o IMZ de partida e os produtos alquilados. Ainda, outras bandas referentes aos estiramentos das ligações carbono hidrogênio, também presentes nas moléculas de IMZ se mantiveram (3113 ; 2952 e 2877 cm^{-1}).⁷⁶

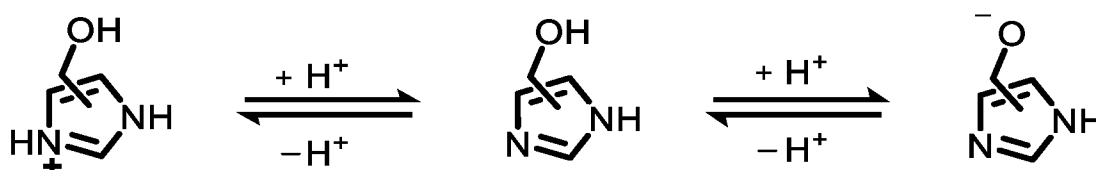
Figura 35 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA O 1-HPZ E 1-HEZ





Como parte da caracterização, os derivados de IMZ foram avaliados por titulação potenciométrica, onde o equilíbrio ácido-base de protonação do anel imidazólico foi avaliado (Figura 36). O segundo equilíbrio ácido-base referente à desprotonação da hidroxila da porção alcoólica não foi detectado, sugerindo que o pK_a dessa espécie deve ter valor típico de álcoois (pK_a entre 16 e 18). Para a determinação do pK_a da hidroxila é necessário processar a titulação em solventes não aquosos.^{77,78}

FIGURA 36 - EQUILÍBRIOS ÁCIDO-BASE APRESENTADOS PELOS HIDROXIIMIDAZOIS



A Figura 37 traz os gráficos com os dados de pH *versus* volume de base adicionado das titulações dos compostos 1-HPZ e 1-HEZ. Adicionalmente, o pK_{aH} do derivado comercial 4(5)HMZ também foi determinado por titulação potenciométrica. As curvas experimentais foram ajustadas com o *software* iterativo BEST7⁶⁹ para determinação dos valores de pK_{aH} que estão apresentados na Tabela 4. Os valores obtidos estão dentro da faixa típica para derivados de IMZ (~ 7) e para o 1-HEZ e 1-HPZ ainda não haviam sido descritos na literatura.^{79 80}

FIGURA 37 - GRÁFICOS DE PH *VERSUS* VOLUME DE BASE PARA OS COMPOSTOS 1-HPZ E 1-HEZ. A LINHA SÓLIDA CORRESPONDE AO AJUSTE TEÓRICO.

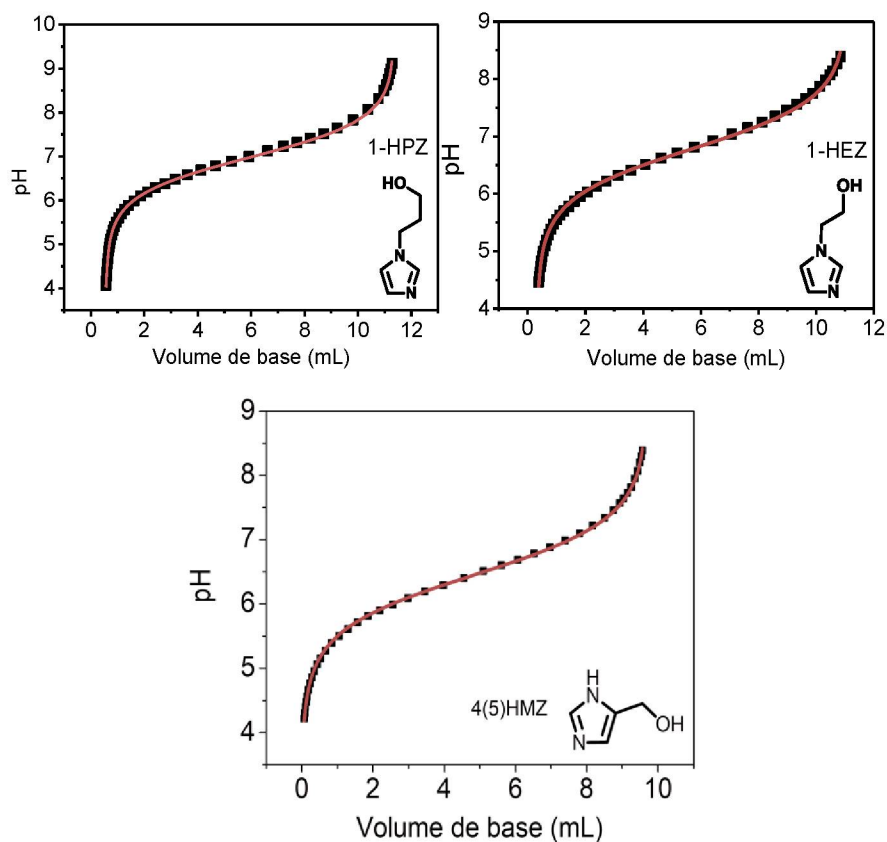
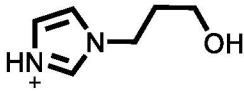
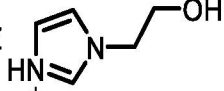
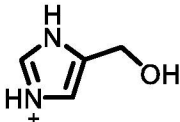


TABELA 4 - VALORES DE pK_{aH} DETERMINADOS PARA OS HIDROXIIMIDAZOIS

	1-HPZ 	1-HEZ 	4(5)HMZ 
pK_{aH}	$6,98 \pm 0,04$	$6,78 \pm 0,05$	$6,54 \pm 0,02$

Os substituintes apresentam um efeito interessante no valor de pK_{aH} determinado para as amostras. No caso onde a hidroxila está ligada mais próxima ao anel de imidazol, 4(5)HMZ e 1-HEZ, 1 e 2 carbonos de distância respectivamente há o abaixamento do valor de pK_{aH} em relação ao imidazol (7,1). Isso mostra que a hidroxila consegue diminuir com relativa intensidade a basicidade do par de elétrons imínico do anel. No caso do 1-HPZ onde a hidroxila está a 3 carbonos de distancia do anel o efeito é menos pronunciado quase anulando o efeito da hidroxila sobre o pK_{aH} .

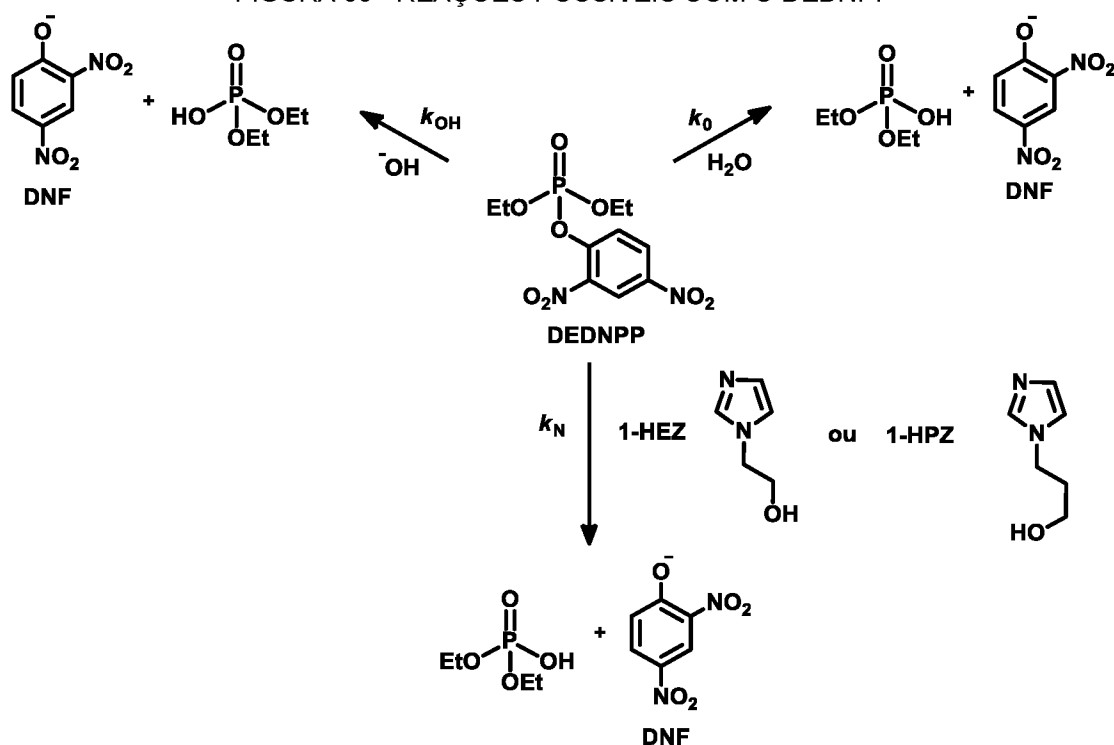
5.2 ESTUDO DA REATIVIDADE DOS HIDROXIIMIDAZOIS NAS REAÇÕES COM ORGANOFOSFORADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o estudo da reatividade dos hidroxiiimidazois nas reações de clivagem dos compostos organofosforados. Para o estudo com o DEDNPP, foram utilizados os hidroxiiimidazois 1-HEZ e 1-HPZ sendo que o 4(5) HMZ já foi estudado previamente no grupo de pesquisa.³⁴ O DEDNPP (triéster de fosfato) é um modelo para pesticida uma vez que sua estrutura é similar ao pesticida Paraoxon. O DEDNPP é mais reativo em relação ao Paraoxon, pois apresenta um grupamento 2,4 dinitrofenolato ligado ao fósforo, sendo a clivagem dessa ligação favorecida em relação a ligação P-O com o grupamento 4-nitrofenolato apresentado pelo Paraoxon. Para o estudo com o BDNPP foram utilizados os hidroxiiimidazois 1-HEZ e 1-HPZ sintetizados e o 4(5)HMZ comercial. Nesse caso, o BDNPP é um modelo para sistemas biológicos uma vez que se apresenta na forma de diéster de fosfato. Para elucidação dos mecanismos, foram utilizadas as técnicas de RMN de ^{31}P , EM e efeito isotópico cinético. Ainda os dados cinéticos foram combinados com os $\text{p}K_{\text{as}}$ dos ácidos conjugados dos hidroxiiimidazois em uma análise físico-química orgânica, sendo essa uma interessante ferramenta de elucidação mecanística.

5.2.1 Estudo cinético das reações dos hidroimidazois com o triéster DEDNPP

No estudo cinético dos hidroxiiimidazois com o DEDNPP, consideramos as reações mostradas na Figura 38, onde o DEDNPP pode sofrer hidrólise espontânea (k_0), hidrólise alcalina (k_{OH}) e reagir com o nucleófilo (k_{N}). O comportamento nucleofílico dos hidroxiiimidazois está associado à reatividade do par de elétrons localizado no nitrogênio imínico, portanto o pH do meio reacional se torna um fator de grande importância no estudo cinético. Assim, a determinação do $\text{p}K_{\text{aH}}$ dos derivados protonados foi fundamental para inferir sobre as espécies reativas. Ainda, deve ser ressaltado que um possível ataque nucleofílico pelo oxigênio da hidroxila do derivado foi descartado visto que o valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ desse grupamento é tipicamente acima de 14, logo só poderia ser observada essa reação em condições fortemente alcalinas.

FIGURA 38 - REAÇÕES POSSÍVEIS COM O DEDNPP



Dessa forma a partir da Figura 38 podemos inferir a lei de velocidade para a reação estudada considerando as reações paralelas sofridas pelo DEDNPP, equação 3. Sob condições de pseudo primeira ordem, o k_{obs} (constante de velocidade observada) é a combinação das constantes de velocidade das várias reações paralelas, Equação 4. Combinando a Equação 4 com as expressões de equilíbrios termodinâmico para as espécies reativas (neutras) dos hidroximidazois, obtém-se a Equação 5, que é a variação de k_{obs} em função do pH. A dedução em detalhes das equações 3, 4 e 5 estão localizadas no apêndice 1.

$$v = (k_0 + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_N[\text{DIMZ}])[\text{DEDNPP}] \quad (3)$$

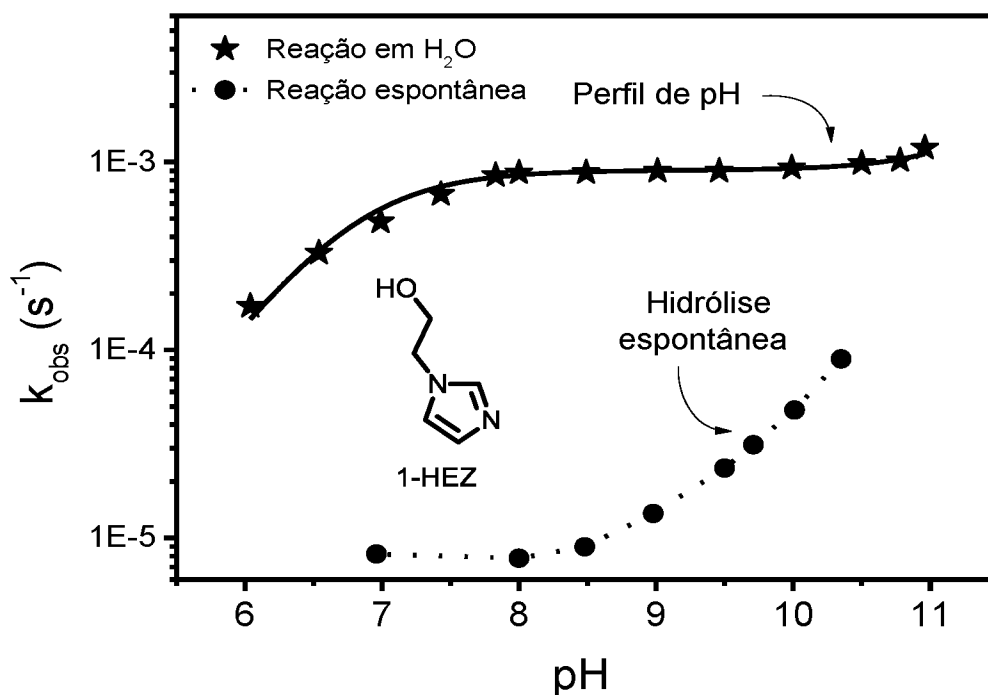
$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_N[\text{DMIZ}] \quad (4)$$

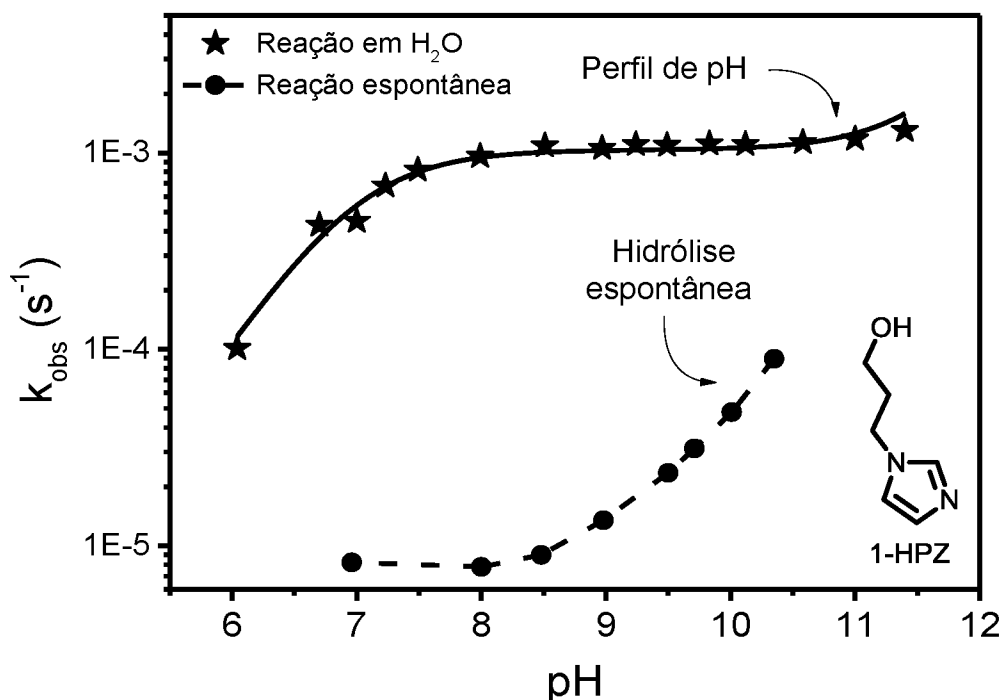
$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}} * 10^{\text{pH}-14} + k_N[\text{DIMZ}] \frac{K_a}{K_a + 10^{-\text{pH}}} \quad (5)$$

Onde v = velocidade, k_0 = constante de velocidade da hidrólise espontânea, k_{OH} = constante de velocidade da hidrólise alcalina, k_N = constante de velocidade da reação com o nucleófilo, $[\text{OH}^-]$ = concentração de íons hidroxila no meio reacional, $[\text{DIMZ}]$ = concentração do nucleófilo avaliado, $[\text{DEDNPP}]$ = concentração do DEDNPP. K_a = constante de equilíbrio de dissociação do ácido-conjugado do nucleófilo estudado, $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$.

O gráfico de k_{obs} versus pH para as reações do DEDNPP com os compostos 1-HPZ e 1-HEZ estão apresentados na Figura 39 conjuntamente com os dados para a reação espontânea, onde as estrelas correspondem aos pontos experimentais e a linha sólida ao ajuste com a equação 5.⁸¹ Conforme previsto, o aumento de k_{obs} a partir de pH 6 está relacionada ao aumento da concentração da espécie neutra (reativa) dos hidroximidazois, seguido da formação de um patamar (entre pH 8 e 10,5) relacionado ao máximo de concentração da espécie reativa dos compostos. Em seguida, tem-se um novo aumento associado à hidrólise alcalina do DEDNPP. Dessa forma, o modelo proposto (Figura 38 e EQUAÇÃO 5) se adequou com sucesso aos dados experimentais, sendo possível determinar o valor da constante de segunda ordem (k_N) para os compostos 1-HEZ e 1-HPZ. As constantes obtidas através dos ajustes cinéticos estão apresentadas na Tabela 5 juntamente com as constantes para IMZ e o (4(5)HMZ), estudado previamente em nosso grupo de pesquisa.^{34,81}

FIGURA 39 - PERFIL DE pH PARA AS REAÇÕES DO DEDNPP COM OS HIDROXIMIDAZOIS 1-HEZ E 1-HPZ.





Os valores obtidos para as constantes de velocidade de segunda ordem (k_N) são acompanhados do aumento do pK_{aH} dos derivados IMZ, que é $IMZ > 1-HPZ > 1-HEZ > 4(5) HMZ$. Dessa forma percebemos que a clivagem do organofosforado é sensível ao aumento da nucleofilicidade do derivado de IMZ estudado, conforme esperado para reações nucleofílicas. Os incrementos catalíticos obtidos para as reações com os derivados sintetizados mostram o poder catalítico dos compostos, chegando a casa de 7×10^5 vezes (k_N/k_0), comparada com a reação espontânea.

TABELA 5 – PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS PARA AS REAÇÕES DO 1-HEZ E 1-HPZ COM O DEDNPP

Reação espontânea ^a			
k_0 (s ⁻¹)	$8,0 \times 10^{-6}$ ^b	k_{OH} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	0,21 ^b
Reação nucleofílica ^a			
Composto	k_N	pK_{aH}	k_N/k_0
1-HEZ	$9,0(\pm 0,1) \times 10^{-3}$	6,78 ^c	$6,2 \times 10^5$ ^b
1-HPZ	$10,3(\pm 0,3) \times 10^{-3}$	6,98 ^c	$7,1 \times 10^5$ ^b
4(5) HMZ	$3,59 \times 10^{-3}$ ^d	6,54 ^c	$2,5 \times 10^5$ ^b
IMZ	$1,77((\pm 0,1) \times 10^{-2}$ ^b	7,10	$12,8 \times 10^5$ ^b

^aReações realizadas a 25 °C, ^bref³¹, ^cDeterminado por titulação potenciométrica, ^dref³⁴

Com objetivo de investigar sobre o mecanismo pelo qual estava ocorrendo a reação entre os hidroximidazóis e o DEDNPP, foi determinado o efeito isotópico

cinético do solvente. O efeito isotópico do solvente é definido como a razão entre a constante de velocidade para a reação em água em relação a reação em solvente deuterado ($k_N^{\text{H}_2\text{O}}/k_N^{\text{D}_2\text{O}}$). Os equilíbrios ácido-base são deslocados em D_2O , devido a menor mobilidade e maior força de ligação apresentada pelo átomo de deutério em relação ao seu isótopo mais estável. Isto é, há um aumento do valor da constante de equilíbrio entre a espécie protonada e a espécie neutra (Figura 40). Dessa forma, se comparamos k_{obs} em condições onde $\text{pH} = \text{pD}$ a diferença pode estar relacionada apenas a uma diferença de concentração da espécie reativa. Assim é necessário fazer um perfil de pD e determinar as constantes de segunda ordem k_N dos nucleófilos. A determinação do efeito isotópico cinético nos oferece informações valiosas sobre o mecanismo de reação. Valores próximos de 1 são característicos de reações onde não há transferência de próton em etapa determinante de velocidade. Reações com catálise ácida ou básica são conhecidas por apresentarem efeitos isotópicos maiores que 2, ou seja, a troca de isótopos torna a reação muito mais lenta em comparação a reação com o isótopo mais estável, uma vez que a reação depende diretamente da quebra de uma ligação com o deutério.⁸² Dessa forma, podemos diferenciar catálise nucleofílica de catálise básica/ácida. A Figura 41 mostra os perfis de pD obtidos para as reações do DEDNPP com os hidroximidazóis 1-HEZ e 1-HPZ, onde os círculos e estrelas correspondem aos pontos experimentais e as linhas solidas ao ajuste com a equação 5.

FIGURA 40 - EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE EM D_2O

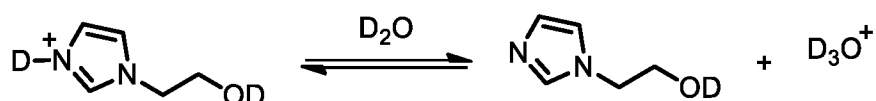
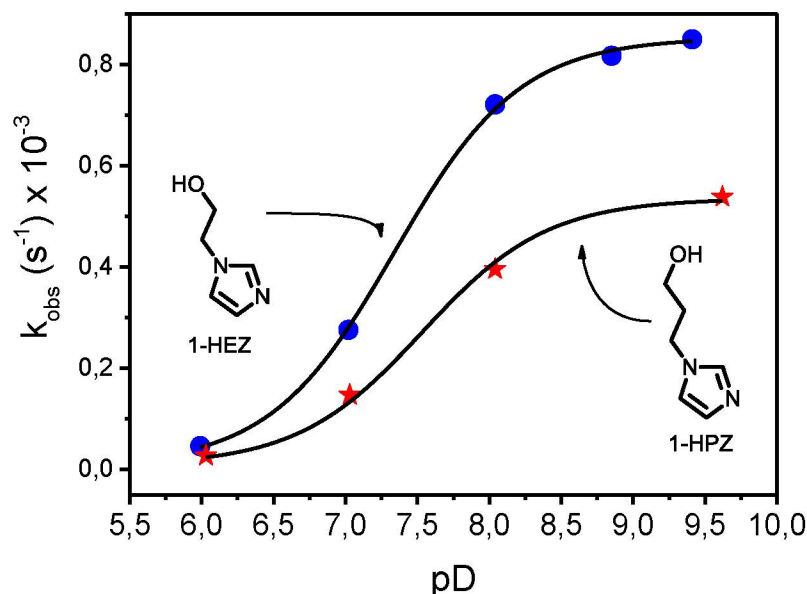


FIGURA 41 - PERFIL DE pD PARA AS REAÇÕES ENTRE O DEDNPP E O 1-HEZ E 1-HPZ



As constantes de velocidade, efeito isotópico e variação de pK_a dos ácidos conjugado dos hidroximidazóis em meio deuterado estão apresentados na Tabela 6. Caso nós tivéssemos comparado os valores de k_{obs} em situações onde o $pH = pD$ teríamos observado um falso valor de efeito isotópico, como apresentado na Tabela 6 onde foram observados deslocamentos de meia unidade nos valores de pK_{aH} relacionada a mudança de solvente. Isso mostra que o nitrogênio imínico do IMZ tem maior afinidade pelo deutério em relação ao hidrogênio, justificando a construção do perfil de pD. Dessa forma, comparando os valores de k_N em H_2O e D_2O , obtem-se o efeito isotópico cinético de solvente real para a reação com os compostos 1-HPZ e 1-HEZ. Os valores obtidos próximos de 1 mostram que a mudança de solvente teve influência praticamente nula na velocidade de reação, evidenciando que não há catálise ácida/básica, assim, sugerindo um mecanismo de catálise nucleofílica, típico de derivados de IMZ. Ainda, podemos observar que não há participação significativa da porção alcoólica dos hidroximidazóis durante a reação, diferente do efeito observado para os hidroximidazóis apresentados na Figura 18 na introdução. Ainda os valores de efeito isotópico para o IMZ e 4(5)IMZ são levemente maiores que 1, indicando um efeito isotópico secundário, entretanto o estudo por outras técnicas (RMN e EM) mostraram que o mecanismo é essencialmente nucleofílico.^{34,81}

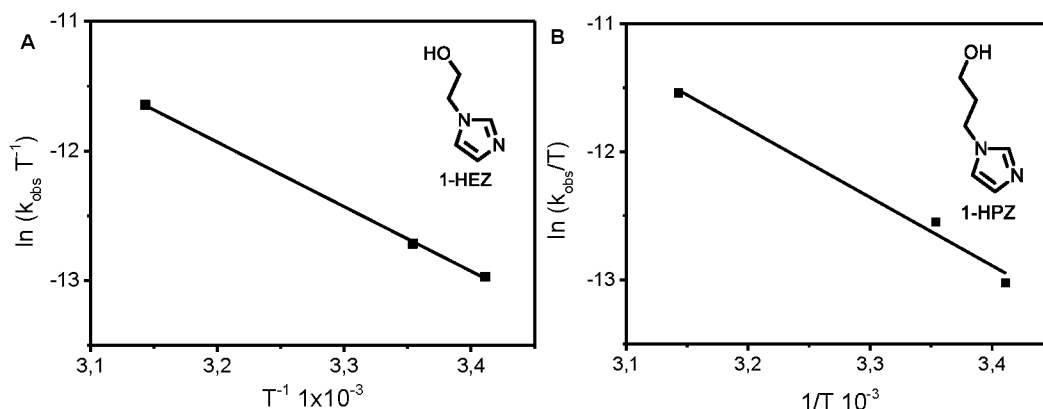
TABELA 6 – EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM DEDNPP

Composto	k_N (D ₂ O) ^a	k_N (H ₂ O)/ k_N (D ₂ O)	pK_{aD} (D ₂ O)	$pK_{aD} - pK_{aH}$ ^e
1-HEZ	$8,5(\pm 0,1) \times 10^{-3}$	1,06	7,34	0,56
1-HPZ	$10,5(\pm 0,3) \times 10^{-3}$	0,98	7,53	0,55
4(5) HMZ ^c	$3,59 \times 10^{-3c}$	1,30	6,98 ^c	0,44
IMZ ^d	$1,4(\pm 0,3) \times 10^{-2}$	1,25	---	---

^aReações realizadas a 25 °C, ^bEstimado pelo ajuste cinético, ^cref³⁴, ^dref³¹, ^eTabela 5

Acerca do entendimento do mecanismo reacional foram determinados os parâmetros termodinâmicos de ativação. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados através dos perfis lineares da equação de Eyring (Equação 6), que estão apresentados na Figura 42. Os parâmetros termodinâmicos de ativação determinados estão apresentados na Tabela 7, juntamente com os dados obtidos anteriormente com 4(5) HMZ e IMZ para fins comparativos.^{34,81}

FIGURA 42 - GRÁFICOS DE EYRING PARA A REAÇÃO DO 1-HEZ (A) E 1-HPZ (B) COM DEDNPP



$$\ln \frac{k_{obs}}{T} = \ln \frac{k_b}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (6)$$

$$\Delta G^\ddagger = -\ln\left(\frac{k_{obs}h}{k_b T}\right)RT \quad (7)$$

Onde: k_{obs} = constante de velocidade observada, T = temperatura (kelvin), k_b = constante de Boltzmann, h = constante de Planck dividida por 2π , ΔS^\ddagger = Entropia de ativação, R = constante universal dos gases ideais, ΔH^\ddagger = entalpia de ativação, ΔG^\ddagger = energia livre de Gibbs de ativação, h = constante de Planck.

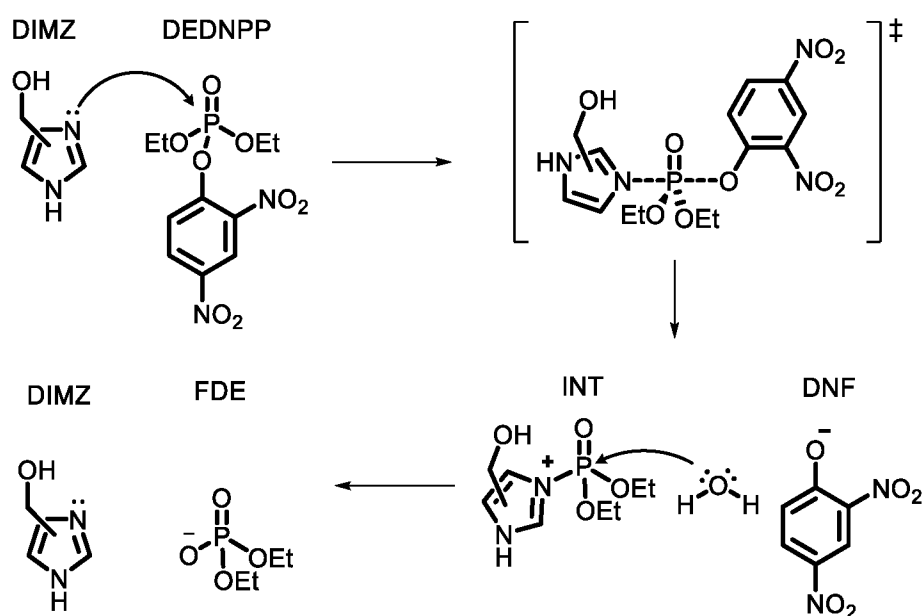
TABELA 7 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM DEDNPP

Composto	ΔG^\ddagger kJ mol ⁻¹	ΔH^\ddagger kJ mol ⁻¹	ΔS^\ddagger (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
1-HEZ	94,72	41,36	-179
1-HPZ	89,95	44,29	-153
4(5)HMZ ^b	95,30	41,42	-179
IMZ ^c	83,75	41,42	-142

^aReações realizadas em pH 9; ^bref³⁴; ^cref⁸¹

Os valores de entalpia e entropia na reações com os hidroiimidazois são bastante próximos aos do IMZ, apontando semelhanças para o estado de transição entre os diferentes compostos derivados de IMZ. O valor de entropia altamente negativo é condizente com perda de graus de liberdade entre os reagentes e estado de transição. Assim podemos relacionar essas perdas com o mecanismo de reação, característicos de reações nucleofílicas.⁸² Dessa forma, propomos um mecanismo de catálise nucleofílica conforme mostrado na Figura 43, já elucidado para o IMZ, onde o átomo de nitrogênio imínico do anel de IMZ ataca o fósforo deslocando o grupo de saída (DNF) e formando um intermediário fosforilado (INT). Esse intermediário sofre uma reação de hidrólise regenerando o derivado de imidazol (DIMZ).⁸¹

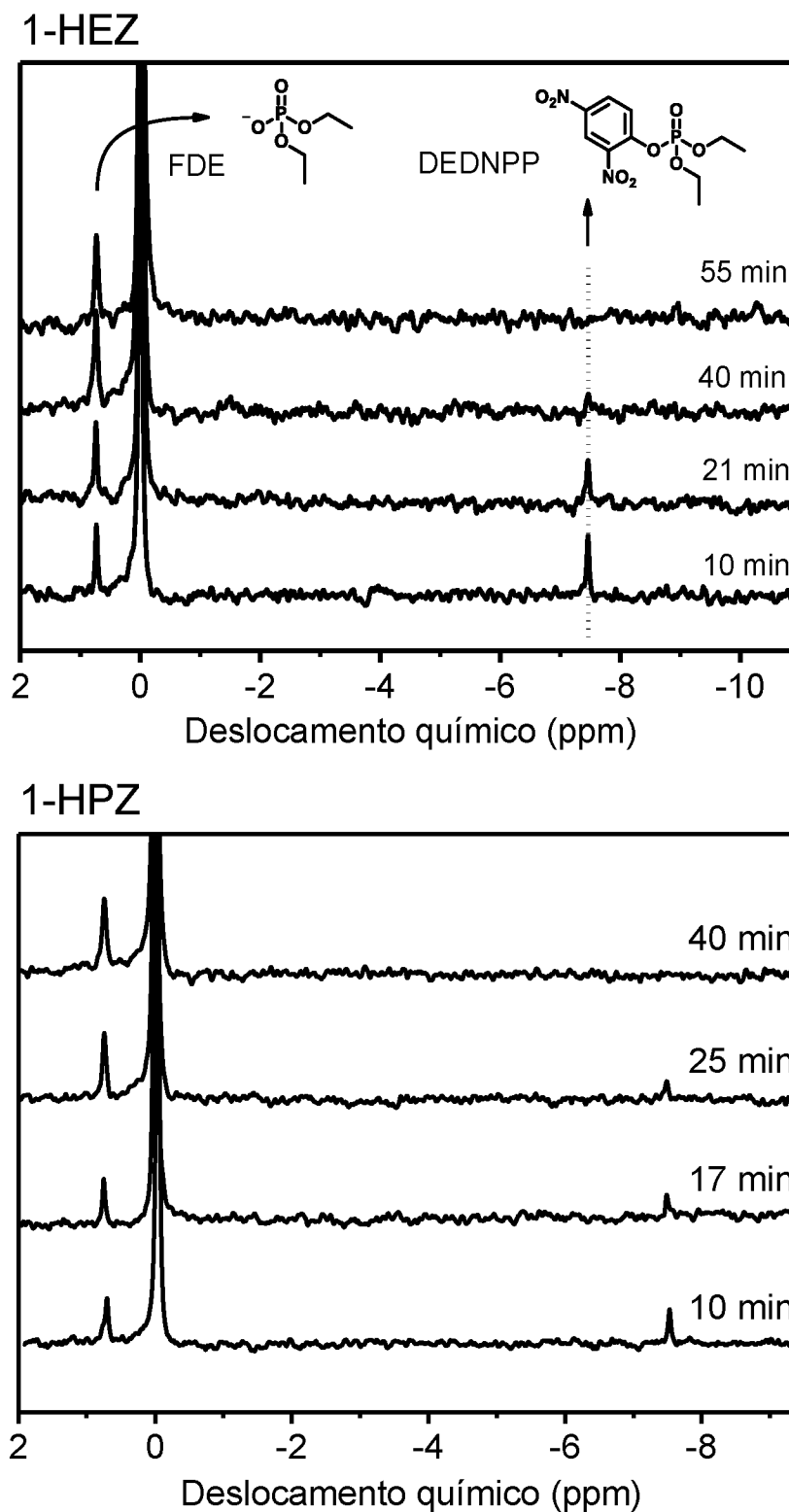
FIGURA 43 - MECANISMO DE CATÁLISE NUCLEOFÍLICA PROPOSTO PARA A REAÇÃO DO 1-HEZ COM O DEDNPP



5.2.2 Análise por RMN ^{31}P das reações dos hidroximidazois com DEDNPP

A partir do mecanismo proposto buscamos detectar a espécie intermediária fosforilada (INT; Figura 43) para as reações com os hidroximidazois 1-HPZ e 1-HEZ com a técnica de RMN ^{31}P . A Figura 44 apresenta quatro espectros obtidos do meio reacional em relação ao tempo para a reação com o 1-HEZ e o DEDNPP. Durante o curso da reação foi possível observar o decréscimo da concentração do reagente DEDNPP (sinal em -7,48 ppm) e o aumento do sinal relativo ao fosfato de dietila (FDE) (0,71 ppm) que é produto da reação. O sinal em 0 ppm é referente ao padrão de ácido fosfórico (85% m/m em D_2O). Nos espectros obtidos não foi possível detectar os intermediários fosforilados (INT; Figura 43) para os hidroximidazois 1-HEZ e 1-HPZ. Esse fato não era de todo inesperado, uma vez que ao serem formados, os respectivos intermediários apresentam dificuldade em estabilizar a carga positiva formada. A Figura 45 compara intermediários para derivados de IMZ com substituintes no nitrogênio (tipo pirrol) do IMZ (A), e sem substituintes no nitrogênio (B). Quando o derivado de IMZ apresenta o nitrogênio (tipo pirrol) ligado a um hidrogênio, o intermediário formado (B) consegue reorganizar sua estrutura aumentando a acidez do hidrogênio (ligado ao nitrogênio). Esse novo equilíbrio ácido-base faz com que os tempos de meia vida do intermediário sejam maiores já que a estrutura neutra se torna mais resistente à hidrólise, sendo possível detectar por RMN, como já visto para IMZ.⁸³

FIGURA 44 – (A) ESPECTROS DE RMN ^{31}P DA REAÇÃO 1-HEZ ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$) COM DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) E (B) REAÇÃO 1-HPZ ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$) COM DEDNPP ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), pH 9.



Por outro lado, quando o nitrogênio apresenta um substituinte no nitrogênio (tipo pirrol) esse equilíbrio ácido-base não se estabelece, facilitando a sua decomposição. De maneira similar, em um estudo anterior⁸⁴ com o DEDNPP e

derivados de IMZ com substituintes metila nas posições 1, 2 e 4(5) (Figura 46) foram detectados os intermediários formados somente para os derivados de IMZ com os substituintes nas posições 2 e 4(5). Já com 1-metilimidazol, o intermediário de reação (INT 1-MEI) também não detectado.⁸⁴

FIGURA 45 - INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS COM DERIVADOS DE IMZ N-SUBSTITUÍDOS (A) E NÃO N-SUBSTITUÍDOS (B)

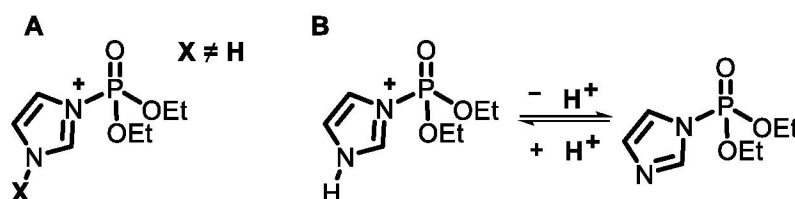
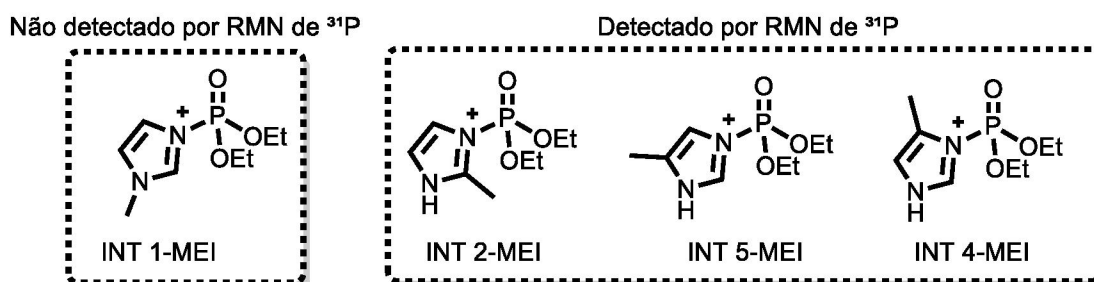


FIGURA 46 - INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS AVALIADOS EM ESTUDO ANTERIOR



5.2.3 Análise por EM das reações dos hidroximidazóis com DEDNPP

Em busca de mais evidências sobre o mecanismo da reação entre o DEDNPP e os hidroximidazóis 1-HEZ e 1-HPZ, alíquotas do meio reacional foram analisadas por EM, usando uma fonte de electrospray no modo negativo e positivo. Assim como para o experimento executado por RMN, buscou-se encontrar as espécies chave para elucidação do mecanismo de reação. A Figura 47 apresenta o espectro da reação do DEDNPP com 1-HEZ no modo positivo. Tem-se o sinal com razão massa carga (m/z) 112,98 é referente à espécie protonada do 1-HEZ, enquanto o sinal com m/z 249,08 apresentou a massa esperada para o intermediário proposto (INT; Figura 43). Dessa forma esse íon foi isolado e fragmentado, e seu espectro MS/MS está apresentado na Figura 48. Vale ressaltar que pela técnica de EM não é possível diferenciar ataques nucleofílicos efetuados pelo nitrogênio dos ataques pelo oxigênio, pois ambos apresentariam a mesma razão m/z . Entretanto, devido a faixa

de pH estudada e a não observação de um produto estável pela técnica de RMN ^{31}P são indícios de um ataque nucleofílico via oxigênio.

FIGURA 47 - ESI-MS (+) DA REAÇÃO DO DEDNPP ($8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) COM 1-HEZ ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), pH 9 e 25°C .

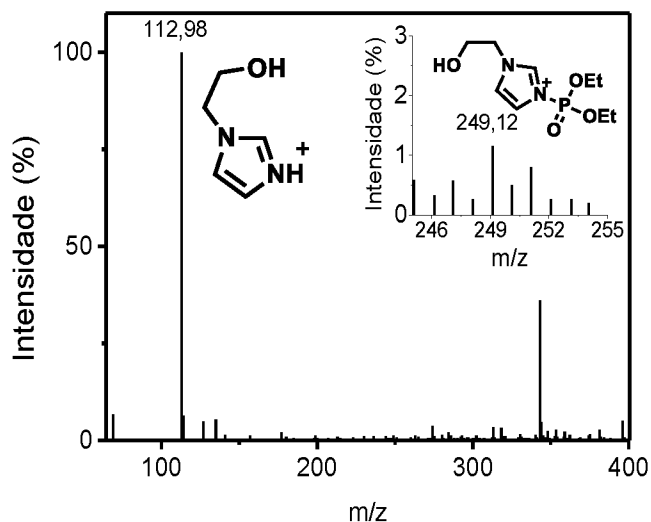
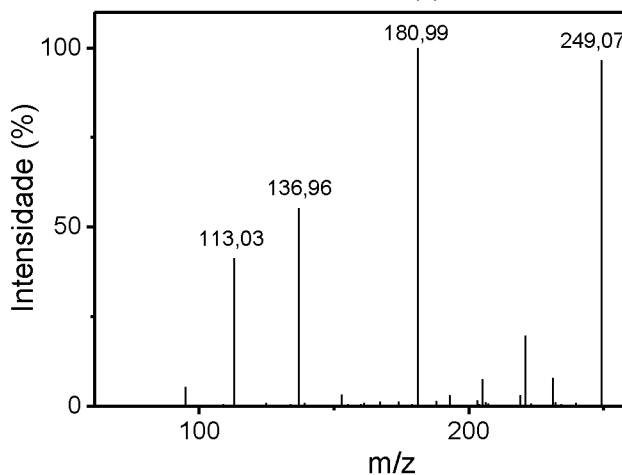
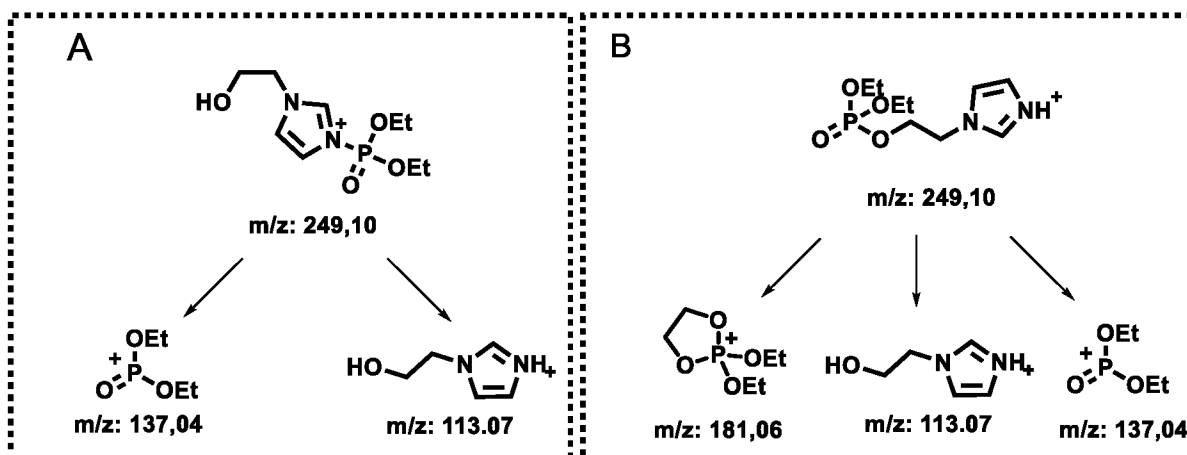


FIGURA 48 - ESPECTRO MS/MS (+) DO ÍON $m/z=249,08$



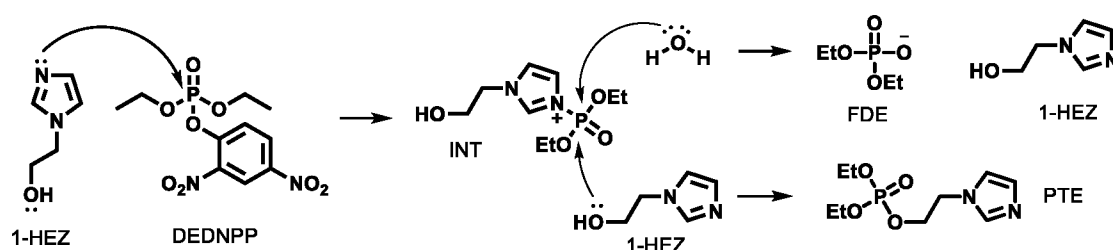
Os sinais derivados da fragmentação do íon de m/z 249,08 (Figura 48) evidenciam o intermediário fosforilado devido ao ataque do grupo IMZ, pelo aparecimento do sinal em 136,96, conforme mostrado abaixo (Figura 49 (A)). Entretanto, o sinal de 180,99 chamou a atenção por sua intensidade, levando a hipótese da formação de uma espécie de $m/z=249,10$ advindo de um ataque nucleofílico do átomo de oxigênio do 1-HEZ sobre o fósforo do intermediário (PTE). De fato, a quebra dessa espécie justificaria o sinal de $m/z=180,99$. (Figura 49; (B)).

FIGURA 49 - POSSÍVEIS FRAGMENTOS PARA OS INTERMEDIÁRIOS DE REAÇÃO DO 1-HEZ E DEDNPP



Para justificar a presença da espécie PTE cuja quebra levaria ao sinal de $m/z=181$, propõe-se que o intermediário (INT; Figura 50) de reação pode ser decomposto por outra molécula de 1-HEZ em competição com a hidrólise do intermediário formando um produto de transesterificação (PTE) de $m/z=249$. Contudo o produto de transesterificação não foi detectado por outras técnicas, sugerindo que esse caminho reacional é pouco favorecido, inclusive devido a concentração do 1-HEZ ser muito menor que a concentração da água no meio reacional. A detecção desse intermediário pode não estar relacionada à sua concentração, mas apenas a estabilidade dos triésteres de fosfato além da facilidade de ionização, consequentemente, detecção.

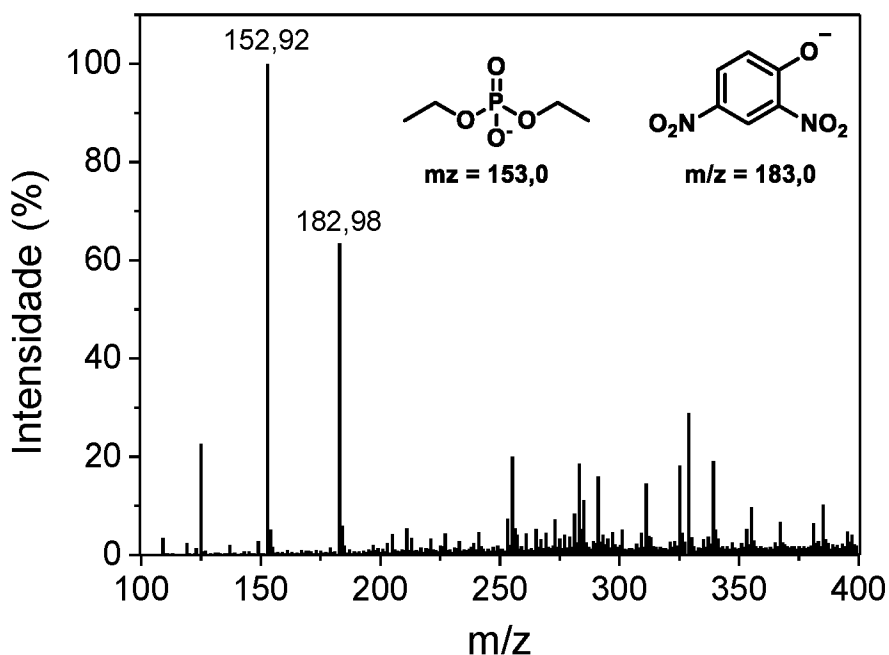
FIGURA 50 - ROTAS PARA DECOMPOSIÇÃO DO INTERMEDIÁRIO DE REAÇÃO DO 1-HEZ COM O DEDNPP



Por fim, também foi realizada a análise por EM no modo negativo da reação do DEDNPP com 1-HEZ que está apresentada na Figura 51. Observou-se dois sinais intensos com m/z condizentes com os produtos de reação DNF ($182,98\ m/z$) e

com o FDE (152,99 m/z) em sua forma desprotonada e como esperado não foi detectado nenhum intermediário.

FIGURA 51 - ESI-MS (-) DA REAÇÃO DO DEDNPP (8×10^{-3} mol.L⁻¹) COM 1-HEZ ($2,5 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹) A pH 9 (25 °C)



Para as reações com o derivado 1-HPZ e DEDNPP os resultados observados por espectrometria de massas foram similares aos observados para reação com o 1-HEZ e DEDNPP. No espectro adquirido (Figura 52) em modo positivo foi possível observar o sinal em 263,15 condizente com a espécie protonada do 1-HPZ e também foi possível observar uma espécie com m/z condizente com o ataque do nitrogênio imínico do 1-HPZ sobre o fósforo (INT2; Figura 53).

FIGURA 52 - ESI-MS (+) DA REAÇÃO DO DEDNPP ($8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) COM 1-HPZ ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) A pH 9 (25 °C)

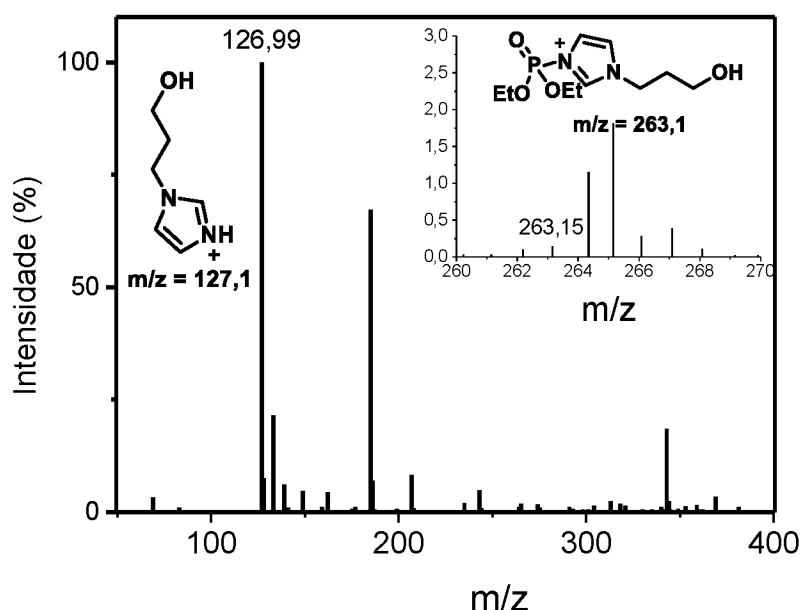
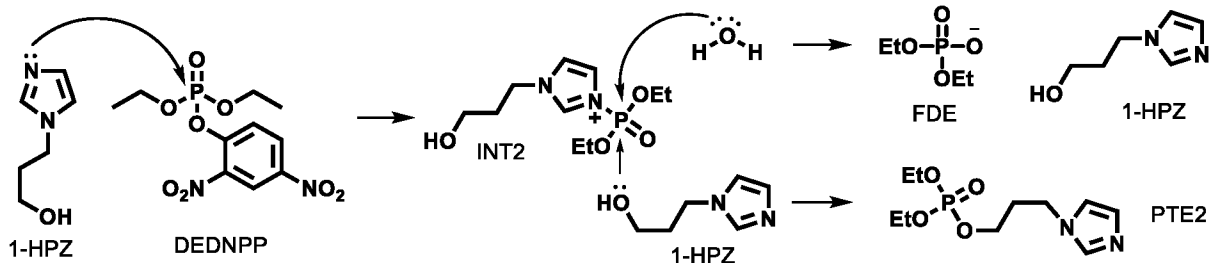


FIGURA 53 - ROTAS PARA DECOMPOSIÇÃO DO INTERMEDIÁRIO DE REAÇÃO DO 1-HPZ COM O DEDNPP



O íon de m/z 263,15 foi isolado e fragmentado (Figura 54), onde é possível observar um padrão quebra condizente com o ataque do nitrogênio imínico ao fósforo, Figura 55 (A). Por outro lado, a quebra da espécie de m/z 263 gerou uma espécie com m/z condizentes com o ataque do oxigênio sobre o fósforo do intermediário, um produto de transesterificação, PTE2 Figura 55 (B), assim como observado para a reação do 1-HEZ com o DEDNPP. O PTE2 não foi observado por outras técnicas como o RMN de ^{31}P , indicando que não é um caminho favorecido e sua observação pela técnica de EM está relacionada a estabilidade de triésteres de fosfato, sua sensibilidade e a facilidade de ionização da estrutura em questão (PTE2).

FIGURA 54 - ESPECTRO MS/MS (+) DO ÍON M/Z=263

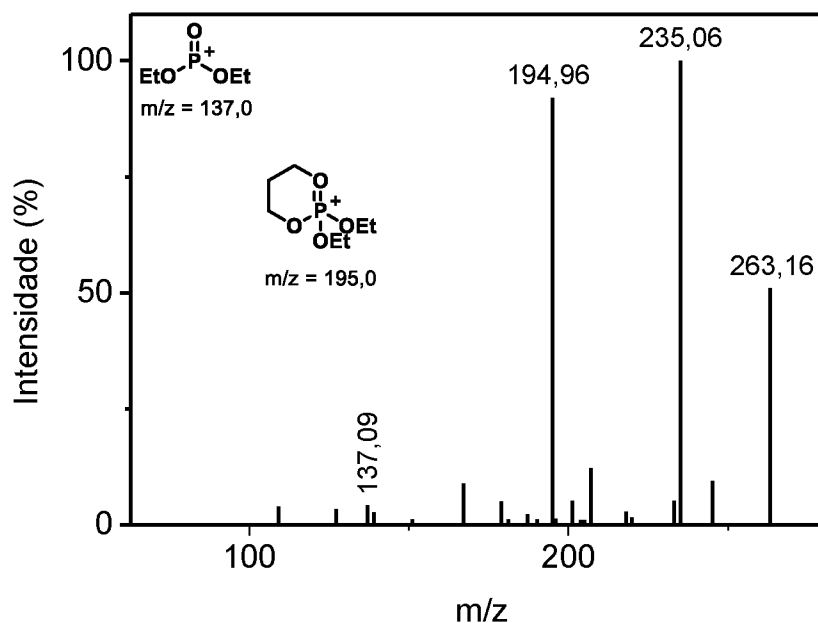
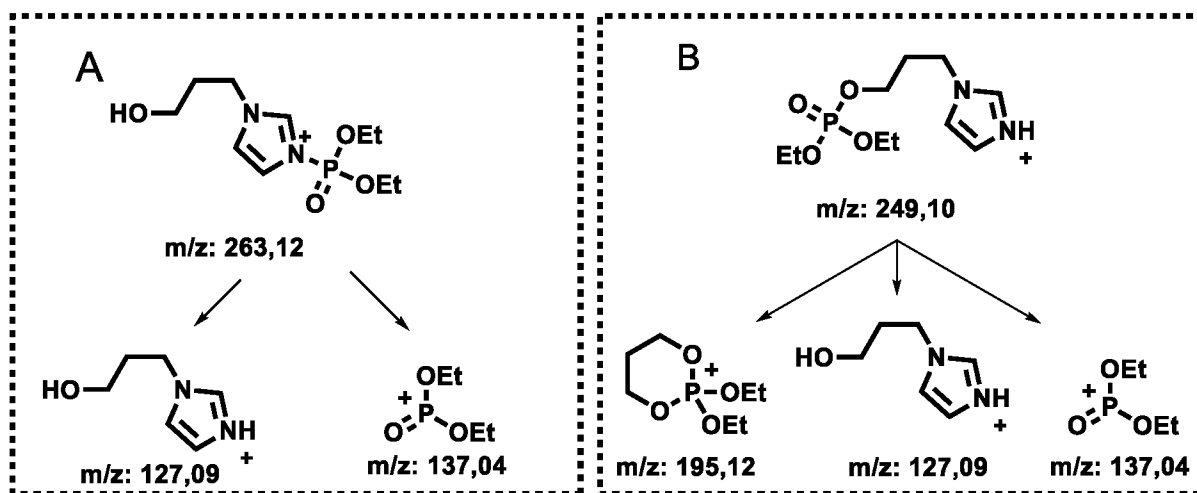
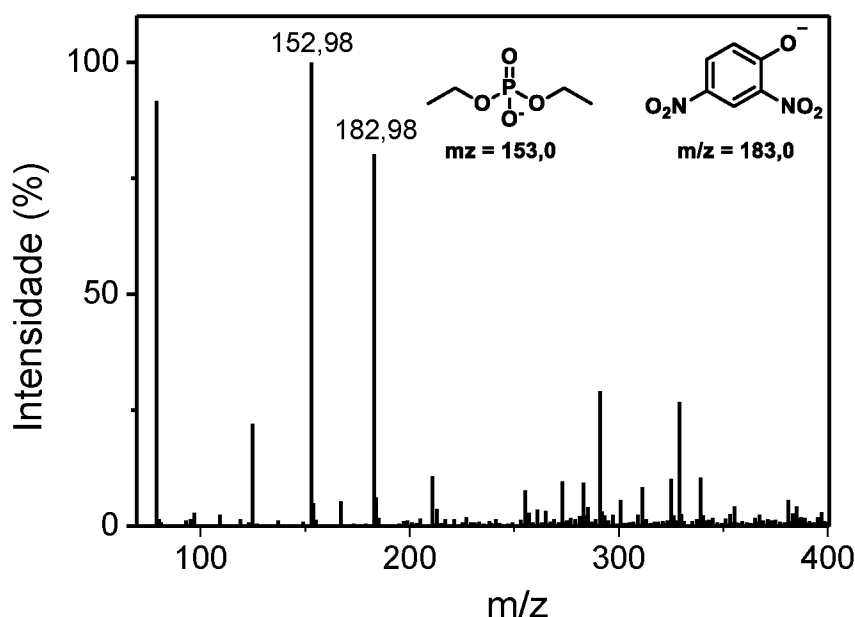


FIGURA 55 - POSSÍVEIS FRAGMENTOS PARA OS INTERMEDIÁRIOS DE REAÇÃO DO 1-HPZ E DEDNPP



Por fim, no espectro obtido em modo negativo (Figura 56) foi possível observar os sinais condizentes com o FDE ($m/z = 153,0$) e DNF ($m/z = 183,0$) assim como esperado pelo mecanismo reacional proposto.

FIGURA 56 - ESI-MS (-) DA REAÇÃO DO DEDNPP ($8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) COM 1-HPZ ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) A pH 9 (25 °C)

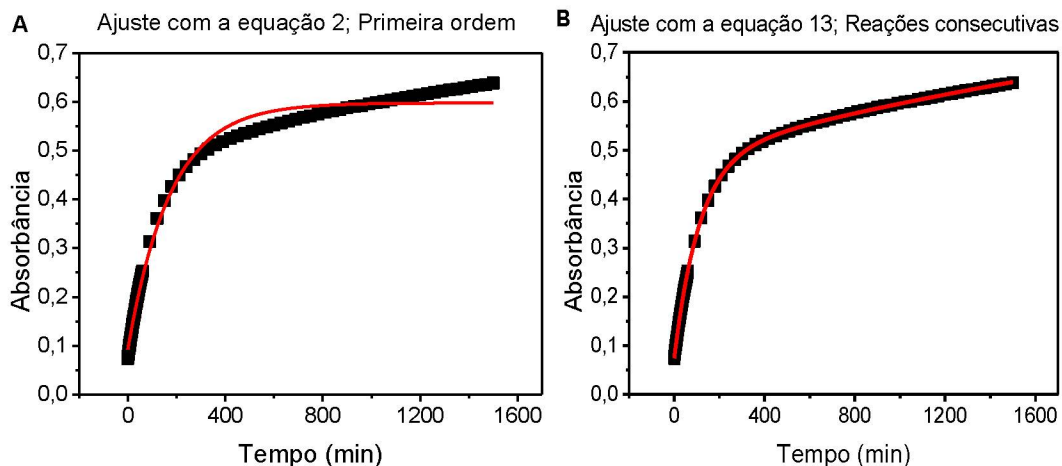


Dessa forma, os resultados obtidos para as reações do DEDNPP com os hidroximidazóis concordam com o mecanismo de catálise nucleofílica (Figura 43), com ataque preferencial pelo grupo nitrogênio imínico ao fósforo.

5.2.4 Estudo cinético das reações dos hidroimidazóis com o diéster BDNPP

Os organofosforados DEDNPP e BDNPP têm bons grupos abandonadores (DNF; $pK_a = 4,2$) em sua estrutura, entretanto o BDNPP por estar na forma de diéster tem sua reatividade bastante diminuída. Para as reações com o organofosforado BDNPP, assim como com a reação do DEDNPP, foram considerados os equilíbrios ácido-base existentes nos derivados de IMZ, bem como as reações paralelas de hidrólise espontânea e alcalina. Para a reação com o DEDNPP, a formação do produto FDE não interferiu no acompanhamento cinético uma vez que esse diéster formado é pouco reativo e essas espécies não absorvem na região do visível onde a reação foi acompanhada. Entretanto, no caso do BDNPP, o produto formado pela quebra da ligação P-O, o monoéster 2,4 dinitrofenil fosfato (DFF) pode sofrer nova clivagem da ligação P-O liberando uma segunda molécula de DNF, influenciando diretamente no acompanhamento cinético, uma vez que o produto das duas clivagens é o mesmo (DNF). Para determinar as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) devemos deduzir uma equação integrada que se encaixe ao modelo de reações consecutivas. A partir da Figura 57 inferimos a lei de

FIGURA 58 - PERFIL CINÉTICO DA REAÇÃO DO 1-HEZ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) COM BDNPP A 25°C E pH 8 AJUSTADOS (LINHA SÓLIDA) COM A EQUAÇÃO TÍPICA DE PRIMEIRA ORDEM (A) E COM A EQUAÇÃO 12 DE REAÇÕES CONSECUTIVAS (B)



Os perfis de pH para as reações dos hidroximidazois 1-HEZ, 1-HPZ e 4(5)HMZ estão apresentados na Figura 59 e apresentam comportamento similar ao observado com DEDNPP, onde a espécie do hidroximidazol neutra é mais reativa. Os perfis foram ajustados com a equação 5 considerando a espécie reativa de cada hidroximidazol, a hidrólise espontânea e alcalina. Para esses perfis foram utilizados os valores de $k_{\text{obs}1}$ (primeira etapa da reação; clivagem do diéster) uma vez que estamos avaliando a reatividade do organofosforado com o diéster (BDNPP). Espera-se que a clivagem do monoéster formado na primeira etapa de reação seja mais lenta em relação ao diéster (BDNPP) uma vez que as cargas negativas presentes no grupamento fosfato repelem fortemente os nucleófilos, além de deslocalizarem a carga tornando-o menos eletrofílico.⁶⁴ Assim, seria necessário um estudo específico para a compreensão da sua reatividade e obtenção dos parâmetros cinéticos, que não é foco de estudo aqui. A Tabela 8 mostra os parâmetros cinéticos obtidos para os nucleófilos na reação com BDNPP, os dados para o IMZ estão também apresentados a fim de comparação.⁸¹

Analisando a Tabela 8, observa-se assim como observado para o DEDNPP, a reatividade dos hidroximidazois segue a ordem crescente de valores de $\text{p}K_{\text{aH}}$. Ainda os incrementos catalíticos evidenciam a capacidade catalítica dos hidroximidazois, sendo as reações com incrementos na ordem de 10^6 vezes mais rápida com a participação do catalisador em relação à reação hidrólise espontânea. Esse fato se

expressa também na baixa reatividade do diéster que, assim, se beneficia mais claramente da catálise.

FIGURA 59 - PERFIS DE pH PARA AS REAÇÕES DO BDNPP COM OS HIDROXIIMIDAZOIS À 25°C. AS LINHAS TRACEJADAS CORRESPONDEM AO AJUSTE COM A EQUAÇÃO 5

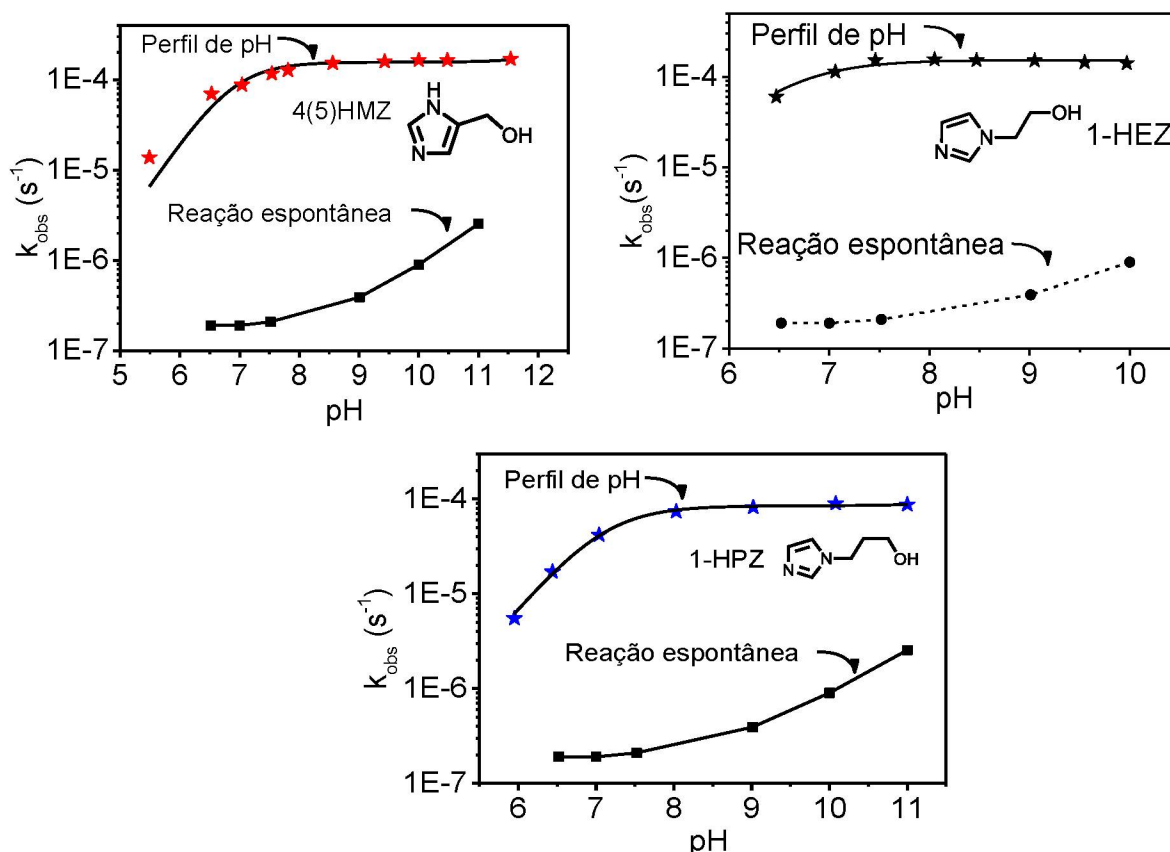


TABELA 8 - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A REAÇÃO COM O BDNPP E OS HIDROXIIMIDAZOIS

Reação espontânea ^a			
k_0 (s ⁻¹)	$1,9 \times 10^{-7}$ ^b	k_{OH} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	0,003 ^b
Reação nucleofílica ^a			
Composto	k_N	pK_{aH}	k_N/k_0
1-HEZ	$1,5 (\pm 0,2) \times 10^{-3}$	6,78 ^c	$5,8 \times 10^5$
1-HPZ	$1,7 (\pm 0,3) \times 10^{-3}$	6,98 ^c	$4,9 \times 10^5$
4(5) HMZ	$5,2 (\pm 0,1) \times 10^{-4}$	6,54 ^c	$1,5 \times 10^{6e}$
IMZ ^b	$1,42 \times 10^{-3}$ ^b	7,10	$4,1 \times 10^5$

^aReações realizadas a 25 °C, ^bref⁸¹

O efeito isotópico cinético também foi avaliado para as reações dos hidroxiimidazóis e o BDNPP, sendo que a Figura 60 apresenta os perfis de k_{obs} versus pD e a Tabela 9 os valores obtidos. Os valores obtidos para efeito isotópico cinético indicam a existência de uma transferência de próton importante durante o curso da reação, entretanto o valor é característico de efeito isotópico secundário (entre 1 e 2).⁸ Esse fato sugere que o efeito ocorre nas vizinhanças de onde de fato está ocorrendo a reação (i.e. o efeito não interfere diretamente no ataque nucleofílico do hidroxiimidazol sobre o fósforo). Quando comparamos com a reação dos mesmos hidroxiimidazóis com o DEDNPP, que não apresentou efeito isotópico, fato que indica uma mudança do mecanismo de clivagem do diéster estudado em relação ao triéster. Assim, propomos um mecanismo de catálise nucleofílica combinado com a ligação de hidrogênio entre a hidroxila alcoólica e oxigênio carregado negativamente do grupamento fosfato Figura 61. Em reações nucleofílicas com ésteres de fosfato já foram observadas transferências de prótons durante a formação do estado de transição, sugerindo que esse tipo de interação pode ser importante no mecanismo reacional.⁸⁵ Dessa forma, a hidroxila pode ajudar a estabilizar o estado de transição e inclusive favorecer a formação de intermediários relativamente estáveis, isto é, intermediários com tempos de meia-vida suficiente para serem detectáveis em técnicas como RMN.

FIGURA 60 - PERFIS DE pD PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM BDNPP

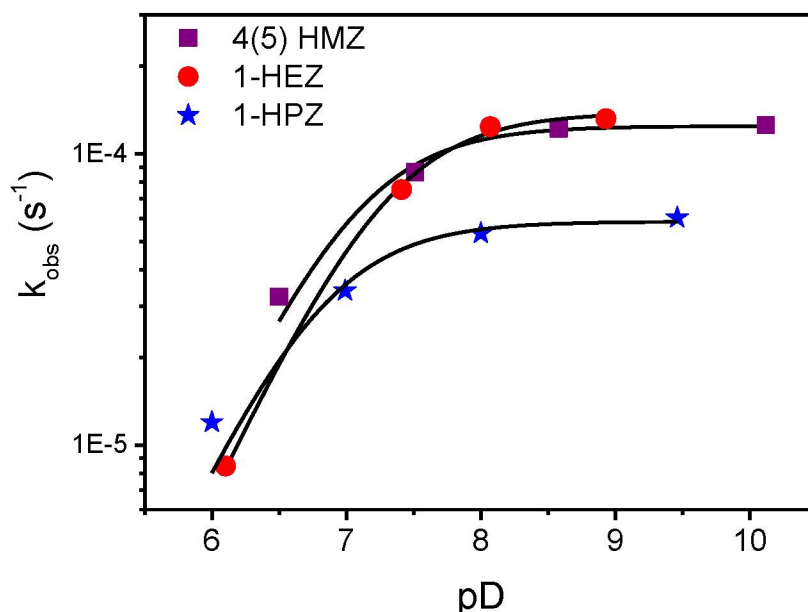
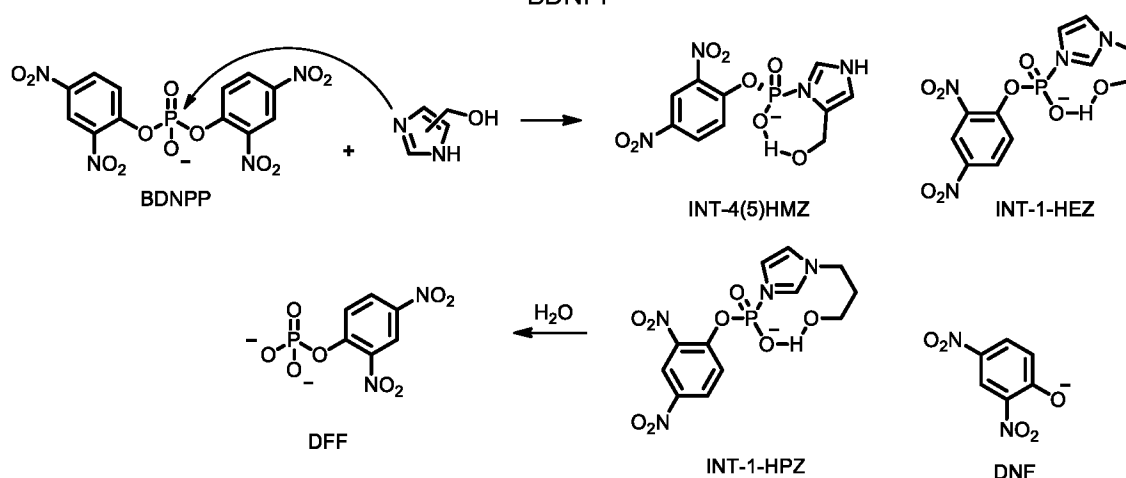


TABELA 9 - EFEITO ISOTÓPICO CINÉTICO PARA AS REAÇÕES DOS HIDROXIIMIDAZOIS COM BDNPP

Composto	pK_{aH}	$k_N (D_2O)^a$	$k_N (H_2O)/k_N (D_2O)$
1-HEZ	6,78 ^c	$1,4 (\pm 0,4) \times 10^{-3}$	1,44
1-HPZ	6,98 ^c	$1,2 (\pm 0,5) \times 10^{-3}$	1,44
4(5) HMZ	6,54 ^c	$4,1 (\pm 0,1) \times 10^{-4}$	1,25
IMZ ^b	7,10	$1,4 (\pm 0,1) \times 10^{-2}$	1,25

^aReações a 25 °C, ^bref⁸¹

FIGURA 61 - MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÕES ENTRE OS HIDROXIIMIDAZOIS E O BDNPP



Assim como para o DEDNPP, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos para as reações com os hidroximidazóis e o BDNPP, que estão apresentados na Tabela 10, os gráficos estão apresentados no apêndice 1. Os valores bastante negativos para a entropia de ativação estão relacionados à perda de graus de liberdade durante a formação do estado de transição em relação aos reagentes livres e indicam o caráter nucleofílico da reação. Todavia os valores de entalpia e entropia não seguem um padrão definido de variação, sugerindo que o substituinte pode afetar de forma diferente cada uma das reações, sendo agora necessário um estudo mecanístico baseado em outras técnicas como RMN.

TABELA 10 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS REAÇÕES DOS DERIVADOS 1-HEZ, 1-HPZ E 4(5)HMZ COM BDNPP^a

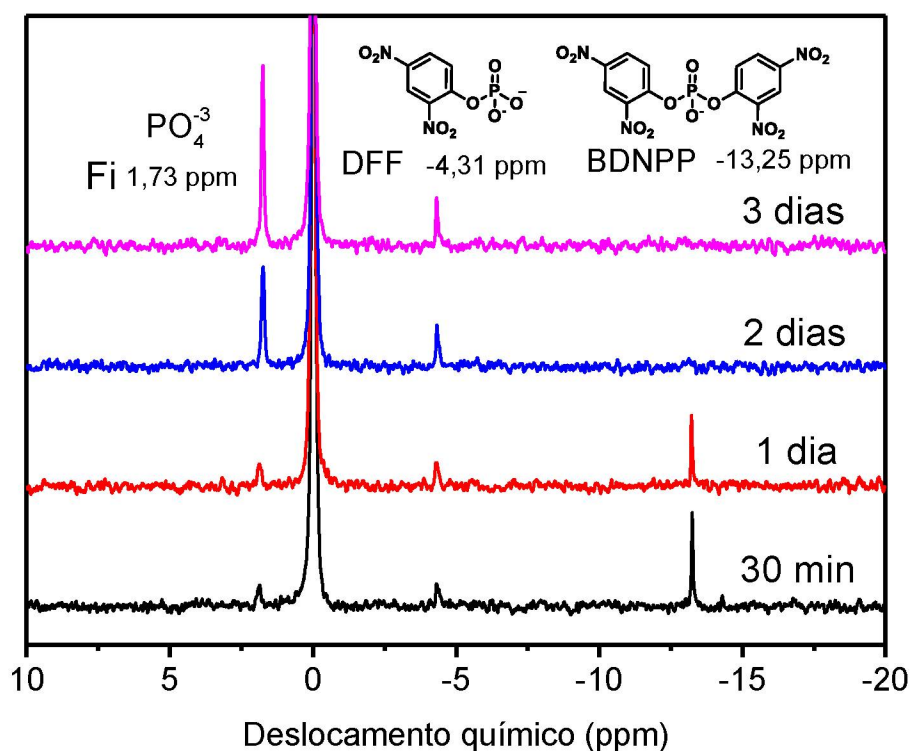
Composto	$\Delta G^\ddagger (kJ mol^{-1})$	$\Delta H^\ddagger (kJ mol^{-1})$	$\Delta S^\ddagger (J K^{-1} mol^{-1})$
1-HEZ	94,14	70,68	-78
1-HPZ	95,03	44,12	-170
4(5) HMZ	103,78	15,46	-296
IMZ ^b	89,74	43,95	-153

^aReações à 25 °C, ^bref⁸¹

5.2.5 Análise por RMN ^{31}P das reações dos hidroximidazois com BDNPP

Com intuito de investigar o mecanismo reacional e detectar as espécies propostas no mecanismo da Figura 61, acompanhou-se as reações dos hidroximidazois por RMN de ^{31}P , uma vez que nessa técnica seria possível observar as espécies chave para elucidação do mecanismo. Os espectros obtidos para a reação com o 1-HPZ com o BDNPP estão apresentados na Figura 62. Durante o curso da reação foram observados três sinais majoritários, que são referentes às três espécies esperadas da reação: o reagente BDNPP em -13,25 ppm, o monoéster DFF em -4,31 ppm e o produto final de reação, o FI em 1,73 ppm, além do padrão H_3PO_4 (85%) em 0 ppm. Ainda o desaparecimento do sinal referente ao BDNPP, o aparecimento do sinal em do DFF com intensidade baixa e a intensificação do sinal do fosfato inorgânico estão de acordo com o comportamento cinético até aqui observado.

FIGURA 62 - ESPECTROS DE RMN ^{31}P DA REAÇÃO 1-HPZ (0,7 mol L) COM BDNPP ($7,5 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$), pH 9,2, TEMPERATURA AMBIENTE.

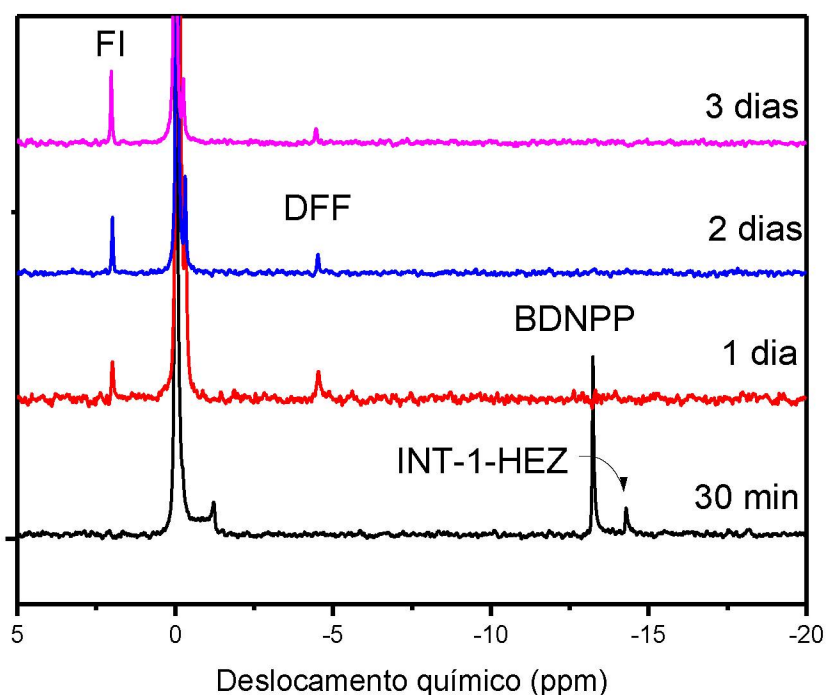


Assim como para o DEDNPP não foi observado o intermediário fosforilado advindo do ataque do nitrogênio do imidazol ao diéster BDNPP. Além disso,

podemos perceber que não há a formação de um produto advindo de um ataque do oxigênio ao átomo de fósforo.

A reação do 1-HEZ com o BDNPP também foi acompanhada por RMN de ^{31}P , e os espectros obtidos para a reação do 1-HEZ estão apresentados na Figura 63. Assim como para as reações com o 1-HPZ, foram observados os sinais referentes às espécies fosforiladas BDNPP (-13,2), DFF (-4,5) e fosfato inorgânico (-2,0). Por outro lado, observamos que no espectro adquirido no início da reação (Figura 63; 30 minutos), houve o aparecimento de uma espécie de deslocamento químico -14,29 ppm. Esse sinal de baixa intensidade pode ser atribuído ao intermediário (INT-1-HEZ) fosforilado proposto na Figura 61 pois apresenta deslocamento característico de espécies fosforiladas contendo um nitrogênio ligado diretamente ao fósforo.⁸⁶ Além disso o desaparecimento do sinal em -14,29 nos espectros adquiridos nos dias 2, 3 e 4 corroboram com a baixa estabilidade esperada para o INT-1-HEZ. A multiplicidade do sinal (simpleto) também concorda com a proposta da formação do INT-1-HEZ, uma vez que nesse caso o fósforo não apresenta acoplamento com hidrogênios aromáticos. Assim, podemos observar que o substituinte hidroxila é capaz de aumentar a estabilidade do intermediário 1-HEZ fosforilado (INT-1-HEZ) corroborando com o mecanismo proposto (Figura 61).

FIGURA 63 - ESPECTROS DE RMN ^{31}P DA REAÇÃO 1-HEZ (0,7 mol L) COM BDNPP ($7,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), pH 9,15.



Os espectros de RMN ^{31}P obtidos para a reação do 4(5)HMZ com o BDNPP estão apresentados na Figura 64. Assim como para as reações com os outros hidroximidazois estudados, os espectros obtidos para a reação do 4(5)HMZ foram observados os sinais referentes ao reagente BDNPP (-13,24), ao monoéster DFF (-4,68) e ao FI (-1,82). Entretanto, durante o curso da reação foram observados 3 sinais além dos 3 já atribuídos, nos levando a um mecanismo de reação mais complexo. No primeiro espectro adquirido (30 minutos), foi possível observar um sinal em -14,55 ppm que pode ser atribuído ao intermediário de reação fosforilado advindo do ataque do nitrogênio ao fósforo, entretanto há duas possibilidades já que o 4(5)HMZ existe como par tautomérico (Figura 65). Dentre as duas possibilidades, o mais provável é que o sinal observado seja referente ao INT-4HMZ, uma vez que nesse caso a ligação de hidrogênio da hidroxila com o grupamento fosfato estabilizaria essa espécie. Ainda relacionado à estabilidade podemos perceber que o tempo de meia vida dessa espécie é relativamente alto pois continuou a ser detectada após 24h de reação (Espectro 2, Dia 1).

FIGURA 64 - ESPECTROS DE RMN ^{31}P DA REAÇÃO 4(5)-HMZ (0,7 mol L) COM BDNPP ($7,5 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$), pH 9,1, temperatura ambiente.

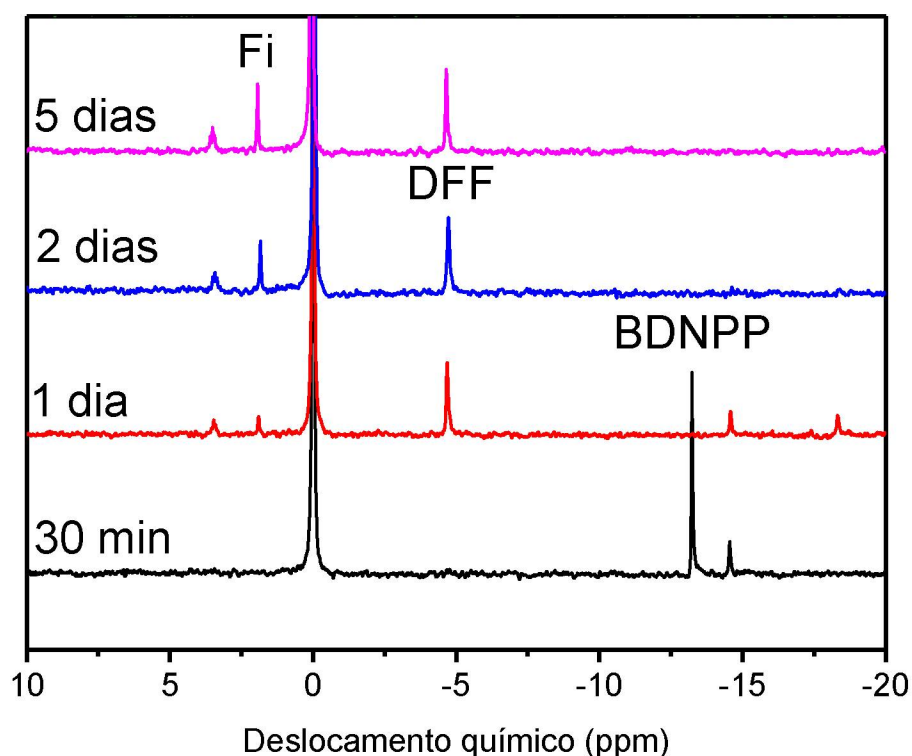
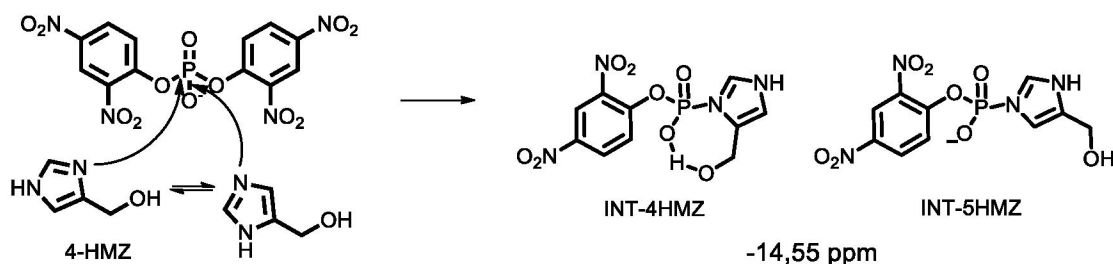
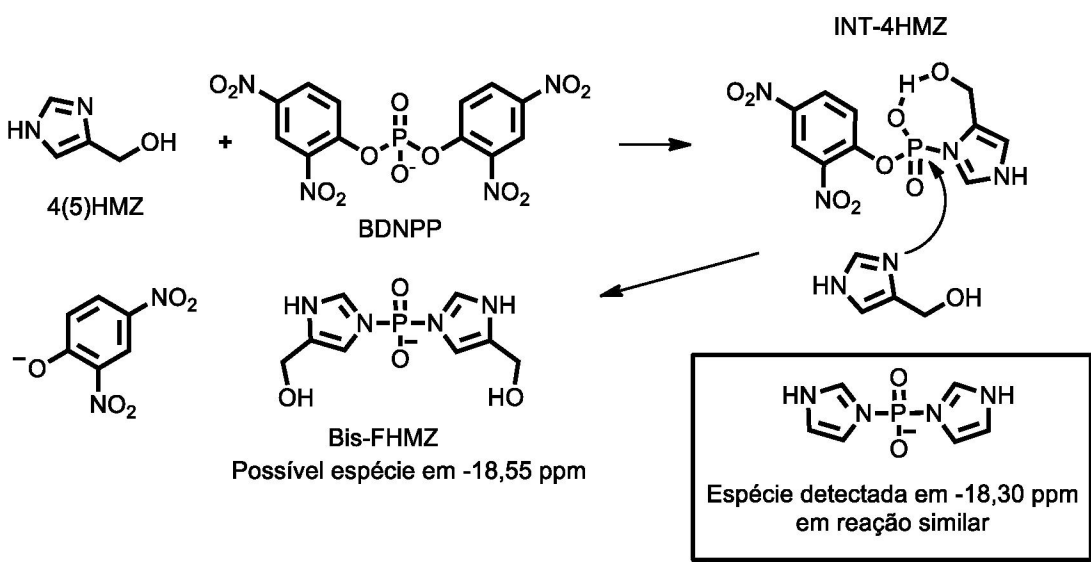


FIGURA 65 - POSSÍVEIS INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS



Para a reação do BDNPP com 4(5)HMZ, Figura 64, no segundo espectro adquirido (Dia 1; linha vermelha) foi possível observar o aparecimento de mais um sinal, em -18,33 ppm. Esse sinal mais deslocado no espectro não era esperado, entretanto é possível que se refira a uma espécie fosforilada ligada a duas moléculas de 4(5)HMZ uma vez que estrutura semelhante já foi observada para reações com o BDNPP com deslocamento químico similar.⁸¹ A origem desse segundo intermediário seria a clivagem do INT-4HMZ por outra molécula do catalisador conforme mostrado na Figura 66.

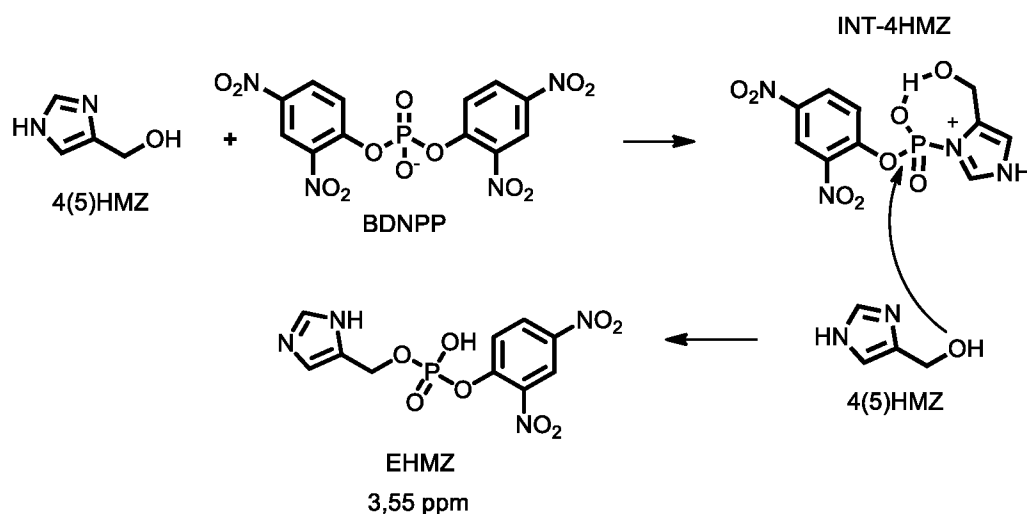
FIGURA 66 - PROPOSTA DE FORMAÇÃO DO BisFHMZ



Por fim, para a reação com o 4(5)HMZ e o BDNPP, Figura 64 o sinal observado em 3,55 ppm deve ser referente a uma espécie de fósforilada ligada um oxigênio advindo de um álcool. Uma vez que o sinal da espécie formada se mostrou

relativamente estável (i.e. não degradou rapidamente, característico da ligação P-O) e ainda o sinal apresentou-se na forma de tripleto ($J = 5,6$ Hz), uma característica relacionada ao acoplamento heteronuclear fósforo-hidrogênio (alifático). Assim o sinal seria resultante da espécie gerada pela alcoolise do intermediário proposto na Figura 65 pelo ataque do oxigênio de outra molécula do 4(5) HMZ gerando EHMZ tal mostrada na Figura 67.

FIGURA 67 – PROPOSTA DE FORMAÇÃO DO PRODUTO EHMZ



O estudo das reações dos hidroximidazóis com o BDNPP por RMN de ^{31}P se mostrou bastante interessante, sendo possível observar um intermediário fosforilado para a reação com o 1-HEZ com o BDNPP, fato incomum para IMZ N-substituídos, indicando a ligação de hidrogênio entre o hidroximidazol e o grupamento fosfato. Isto é, essa interação intramolecular estabiliza o intermediário fosforilado e está de acordo com o efeito isotópico obtido anteriormente. No caso do 4(5) HMZ, o aparecimento de várias espécies fosforiladas evidenciaram que a reação passa por mais caminhos além dos propostos inicialmente a partir do estudo cinético. Isso não foi observado em estudo anterior com DEDNPP, mostrando como a diferente reatividade de ésteres de fosfato (diéster em contraste ao triéster) pode mudar significativamente o mecanismo.³⁴

5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA ORGÂNICA

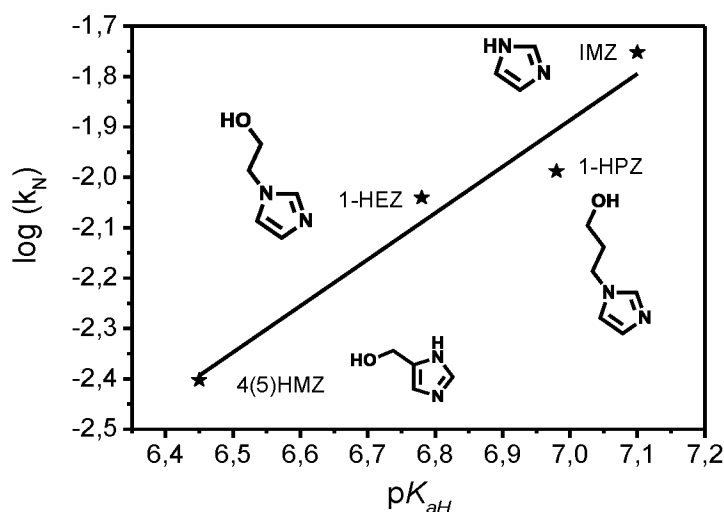
O estudo das reações químicas do ponto de vista da físico-química orgânica se baseia principalmente nas relações lineares de energia livre, que correlacionam

parâmetros termodinâmicos (e.g. constante de equilíbrio; pK_a) com as constantes de velocidade das reações. A equação de Bronsted relaciona o pK_a de um nucleófilo com a constante de velocidade (equação 13), então quando plotamos o pK_a do nucleófilo *versus* o logaritmo da constante de velocidade (caso a classe de nucleófilos siga o mesmo mecanismo reacional) obtemos uma reta na qual o coeficiente angular, chamado de β_{Nuc} que expressa o quanto a reação é sensível a mudança de pK_a do nucleófilo.⁸

$$\log(k) = \beta_{nuc} pK_{aH} + \log C \quad (13)$$

Ainda, variando o grupo de saída do substrato, um *plot* semelhante ($\log k_n$ *versus* pK_a do grupo abandonador) pode ser obtido, determinando-se o parâmetro β_{LG} que mostra a sensibilidade da reação ao pK_a do grupo abandonador. Combinando os valores β_{Nuc} e β_{LG} obtemos o *plot* de More O'Ferrall–Jencks, bastante útil na elucidação do mecanismo de reações.⁸ Para reações com triésteres de fosfato utilizando fenóxidos como nucleófilos e DNF e 4-nitrofenol como grupos de saída valores já descritos desse parâmetro foram de 0,12 e 0,54 respectivamente, para mecanismos concertados.⁸⁷ Assim, um estudo físico-químico orgânico é importante para uma compreensão mais detalhada da reação. A Figura 68 apresenta o gráfico de Bronsted para reação do DEDNPP com os nucleófilos estudados nesse trabalho (1-HEZ e 1-HPZ), juntamente com 4(5)HMZ e IMZ.

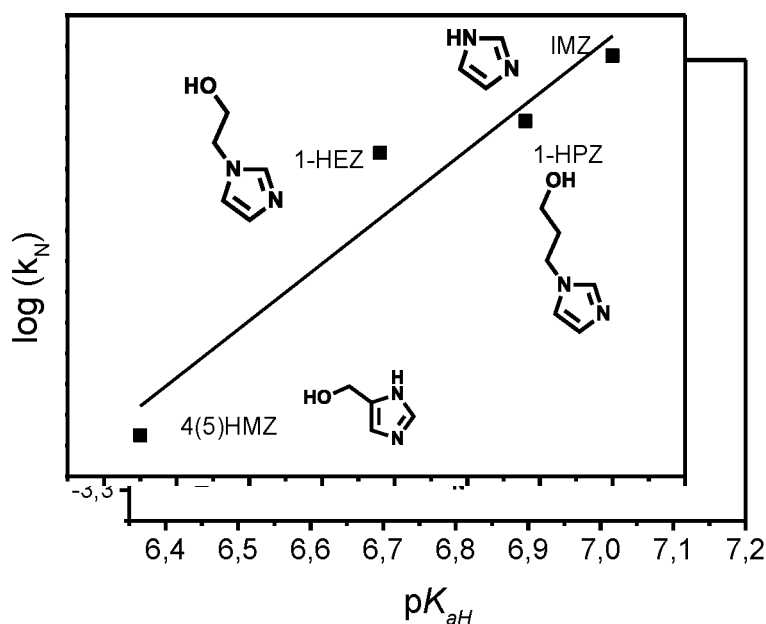
FIGURA 68 - PLOT DE BRONSTED PARA AS REAÇÕES COM DEDNPP



Observou-se um perfil linear, indicando que essa classe de reações segue o mesmo mecanismo. Ainda, obteve-se o parâmetro β_{Nuc} de $0,92(\pm 0,15)$, de acordo com reações nucleofílicas de caráter concertado.⁸⁷ Para uma a mesma reação com derivados de piridina foi obtido um valor de $0,43$ conjuntamente com um perfil linear, de acordo, também com um mecanismo concertado.⁸⁸

Para a reação dos hidroximidazóis com o BDNPP, o gráfico de Bronsted obtido está apresentado na Figura 69, que também evidenciou uma reta, sendo obtido um valor de β_{Nuc} de $0,92 (\pm 0,17)$ assim também condizendo com um mecanismo de catálise nucleofílica para a quebra do diéster, para outro conjunto de nucleófilos com mecanismo de reação concertado foi observado um valor de $0,42$.⁸¹

FIGURA 69 - GRÁFICO DE BRONSTED PARA REAÇÃO DO BDNPP



6 CONCLUSÕES

A síntese do organofosforado DEDNPP e dos hidroximidazóis alquilados no nitrogênio (1-HPZ e 1-HEZ) foi realizada com sucesso. O estudo cinético, EM, de RMN de ^{31}P com o organofosforado DEDNPP e os compostos 1-HEZ e 1-HPZ buscou elucidar o mecanismo de reação com o qual os hidroximidazóis reagem com o triéster. Ainda os incrementos catalíticos para essas reações se mostraram bastante alto $\sim 6 \times 10^5$ para o 1-HEZ e $\sim 7 \times 10^5$ para o 1-HPZ. Os dados sugerem que o mecanismo de catálise nucleofílica dos hidroximidazóis com DEDNPP ocorrem de forma similar ao com IMZ, onde o nitrogênio do grupo IMZ ataca nucleofilicamente o átomo de fósforo levando a um intermediário instável que é rapidamente hidrolisado, regenerando o hidroximidazol de partida. Os hidroximidazóis se mostraram catalisadores com menor poder nucleofílico que o próprio IMZ, entretanto apresentam maior atividade em condições mais brandas de pH uma vez que o pK_{aH} do ácido conjugado faz com que a espécie neutra apresente concentrações apreciáveis em menores condições de pH. Ainda a contribuição do substituinte com hidroxila não foi evidente provavelmente por se tratar de um triéster bastante reativo.

Avaliou-se a reatividade dos hidroximidazóis (1-HEZ, 1-HPZ e 4(5)HMZ) com o composto diéster menos reativo, BDNPP. Foram observados incrementos catalíticos ainda maiores para a reação com o BDNPP ($4(5)\text{HMZ} > 1,5 \times 10^6$, $1\text{-HEZ} > 4,3 \times 10^6$ e $1\text{-HPZ} > 4,9 \times 10^6$), evidenciando a grande versatilidade dos derivados de IMZ e a importância da compreensão na reatividade com diésteres de fosfato presentes em meio biológico. Propõe-se no caso do BDNPP, que o grupo hidroxila do catalisador hidroximidazol pode auxiliar na estabilização do ET, chegando a formar intermediários fosforilados estáveis, através de uma ligação de hidrogênio com o oxigênio aniônico da fosforila. Os estudos por RMN mostraram a presença de intermediários fosforilados mesmo para o 1-HEZ substituído na posição 1 que torna essas espécies instáveis, isso mostra a porção hidroxila pode ajudar na estabilização dessas espécies bem como ser a responsável por alterar a reatividade dos compostos derivados de imidazol. Por fim, foi feita uma análise físico-química orgânica, onde foram obtidos os gráficos de Bronsted. Em ambos os casos para o DEDNPP e BDNPP, foi observado um perfil linear, indicando que todas reações seguem o mesmo mecanismo concertado.

De maneira geral, esse estudo é importante para esclarecer a reatividade dos hidróxiimidazóis e ajuda na projeção de novos catalisadores com características ótimas. Isto é, o grupo hidroxila vizinho ao grupo IMZ pode auxiliar na reação, dependendo da natureza do éster. Isso pode nortear aplicações na projeção de enzimas artificiais, pela perspectiva da importância biológica dos organofosforados ou ainda para processos de detoxificação, pelo viés dos pesticidas e armas químicas. Vale ressaltar, que essa projeção tem que considerar o alvo, visto que por exemplo, nos sistemas biológicos tem-se diésteres de fosfato e nos pesticidas, triésteres de fosfato.

REFERENCIAS

1. LAIDLER, K. J. Chemical kinetics and the origins of physical chemistry. **Archive for History of Exact Sciences**, v.32, n.1, p.43. 1985.
2. DENISOV, E. T.; SARKISOV, O. M.; LIKHTENSHTĖIN, G. I. **Chemical Kinetics: Fundamentals and New Developments**. Elsevier. 2003. p.
3. ORTH, E. S.; ALMEIDA, T. G.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, A. R.; OCAMPOS, F. M. M.; BARISON, A. Mechanistic insight on the catalytic detoxification of Paraoxon mediated by imidazole: Furnishing optimum scaffolds for scavenging organophosphorus agents. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.403, p.93. 2015.
4. BRUCE, T. C.; BLASKO, A.; ARASASINGHAM, R. D.; KIM, J.-S. Participation of two carboxyl groups in phosphodiester hydrolysis. 2. A kinetic, isotopic, and ³¹p nmr study of the hydrolysis of a phosphodiester with carboxyl groups fixed in an attack conformation. **Journal of the American Chemical Society**, v.117, n.49, p.12070. 1995.
5. CAMPOS, R. B.; MENEZES, L. R.; BARISON, A.; TANTILLO, D. J.; ORTH, E. S. The Importance of Methyl Positioning and Tautomeric Equilibria for Imidazole Nucleophilicity. **Chemistry: A European Journal**, v.22, n.43, p.15521. 2016.
6. CASTRO, E. A.; HORMAZABAL, A.; SANTOS, J. G. Concerted mechanism of the reactions of 2, 4-dinitrophenyl 4-cyanobenzoate with secondary alicyclic amines in aqueous ethanol. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.30, n.4, p.267. 1998.
7. CHUPAS, P. J.; CHAPMAN, K. W.; JENNINGS, G.; LEE, P. L.; GREY, C. P. Watching nanoparticles grow: The mechanism and kinetics for the formation of TiO₂-supported platinum nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n.45, p.13822. 2007.
8. ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern physical organic chemistry**. University Science Books. 2006. p.
9. BUNTING, J. W.; TOTH, A.; KANTER, J. P. Kinetics and mechanism of the formation of N-vinyl pyridinium cations in elimination reactions in aqueous base. **Canadian Journal of Chemistry**, v.70, n.4, p.1195. 1992.
10. DECHANT, J. Compendium of chemical terminology. **Acta Polymerica**, v.39, n.3, p.150. 1988.

11. In *Chemistry of Heterocyclic Compounds*; John Wiley & Sons, Inc.: 2008, p 3.
12. BAHL, A. **Essential Of Physical Chemistry (M.E)**. S. Chand Limited. 2014. p.
13. LINDSTRÖM, B.; PETTERSSON, L. J. A brief history of catalysis. **Cattech**, v.7, n.4, p.130. 2003.
14. [HTTPS://WWW.NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/PEACE/LAUREATES/2013/OPCW-FACTS.HTML](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/peace/laureates/2013/opcw-facts.html) Accessed in May, 5, 2017.
15. FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. Springer Science & Business Media. 2011. p.
16. HOUSE, J. E. **Principles of chemical kinetics**. Academic Press. 2007. p.
17. DENISOV, E.; SARKISOV, O.; LIKHTENSHTAIN, G. I. I. **Chemical Kinetics: Fundamentals and Recent Developments**. Elsevier. 2003. p.
18. EREZ, E.; FASS, D.; BIBI, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature**, v.459, n.7245, p.371. 2009.
19. NISHIKAWA, S.; MORIOKA, H.; KIM, H. J.; FUCHIMURA, K.; TANAKA, T.; UESUGI, S.; HAKOSHIMA, T.; TOMITA, K.; OHTSUKA, E.; IKEHARA, M. Two histidine residues are essential for ribonuclease T1 activity as is the case for ribonuclease A. **Biochemistry**, v.26, n.26, p.8620. 1987.
20. D'SOUZA, V. T.; BENDER, M. L. Miniature organic models of enzymes. **Accounts of Chemical Research**, v.20, n.4, p.146. 1987.
21. KNIGHT, D. W. In *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
22. HOFMANN, C. In *Chemistry of Heterocyclic Compounds*; John Wiley & Sons, Inc.: 2008, p 3.
23. COLOMBO, L.; BLECKMANN, P.; SCHRADER, B.; SCHNEIDER, R.; PLESSER, T. Calculation of normal vibrations and intra-and intermolecular force constants in crystalline imidazole. **The Journal of Chemical Physics**, v.61, n.8, p.3270. 1974.

24. ZHURAVLEVA, I. Evaluation of the polarity and boiling points of nitrogen-containing heterocyclic compounds by gas chromatography. **Russian Chemical Bulletin**, v.49, n.2, p.325. 2000.
25. CAMMERS, A.; PARKIN, S. Solid state hydrogen bonding in imidazole derivatives: a persistent tape motif {. **CrystEngComm**, v.6, n.29, p.168. 2004.
26. KIM, O.; KIM, S. Y.; AHN, H.; KIM, C. W.; RHEE, Y. M.; PARK, M. J. Phase behavior and conductivity of sulfonated block copolymers containing heterocyclic diazole-based ionic liquids. **Macromolecules**, v.45, n.21, p.8702. 2012.
27. MAJUMDAR, S.; SPAETH, M. M.; SIVENDRAN, S.; JUNTUNEN, J.; THOMAS, J. D.; SLOAN, K. α -(1H-Imidazol-1-yl) alkyl (IMIDA) carboxylic acid esters as prodrugs of carboxylic acid containing drugs. **Tetrahedron Letters**, v.48, n.26, p.4609. 2007.
28. ZHU, X.; SU, L.; HUANG, L.; CHEN, G.; WANG, J.; SONG, H.; WAN, Y. A Facile and Efficient Oxalyldihydrazide/Ketone-Promoted Copper-Catalyzed Amination of Aryl Halides in Water. **European Journal of Organic Chemistry**, v.2009, n.5, p.635. 2009.
29. LIPKIND, D.; PLIENRASRI, C.; CHICKOS, J. S. A Study of the Vaporization Enthalpies of Some 1-Substituted Imidazoles and Pyrazoles by Correlation-Gas Chromatography. **Journal of Physical Chemistry B**, v.114, n.50, p.16959. 2010.
30. WALLACH, O.; WÜSTEN, M. Ueber die Condensation aromatischer Amine mit Milchsäure. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.16, n.2, p.2007. 1883.
31. ICHIKAWA, A.; TANAKA, S. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
32. BHATNAGAR, A.; SHARMA, P.; KUMAR, N. A review on "Imidazoles": Their chemistry and pharmacological potentials. **International Journal of PharmTech Research**, v.3, n.1, p.268. 2011.
33. GUPTA, R. R.; KUMAR, M.; GUPTA, V. **Heterocyclic Chemistry: Volume II: Five-Membered Heterocycles**. Springer Berlin Heidelberg. 2013. p.
34. CAMPOS, R. B. **A reatividade de derivados de imidazol na transferência do grupo fosforila**. 2017. p.

35. SUNDBERG, R. J.; MARTIN, R. B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. **Chemical Reviews**, v.74, n.4, p.471. 1974.
36. TOMIZAKI, K.-Y.; SHIMIZU, S.; ONODA, M.; FUJIOKA, Y. An Acid Dissociation Constant (p K a)-based Screening of Chemical Absorbents that Preferably Capture and Release Pressurized Carbon Dioxide for Greenhouse Gas Control. **Chemistry Letters**, v.37, n.5, p.516. 2008.
37. TANOKURA, M. ¹H-NMR study on the tautomerism of the imidazole ring of histidine residues: I. Microscopic pK values and molar ratios of tautomers in histidine-containing peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.742, n.3, p.576. 1983.
38. CONTRERAS, J. G.; MADARIAGA, S. T. Intramolecular proton transfer in tautomeric 2-Imidazolone and 2-thioimidazolone. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v.16, n.1, p.47. 2003.
39. MOCK, W. L.; MORSCH, L. A. Low barrier hydrogen bonds within salicylate mono-anions. **Tetrahedron**, v.57, n.15, p.2957. 2001.
40. JENCKS, W. P.; CARRIUOLO, J. General Base Catalysis of Ester Hydrolysis1. **Journal of the American Chemical Society**, v.83, n.7, p.1743. 1961.
41. BRUCE, T. C.; SCHMIR, G. L. Imidazole catalysis. II. The reaction of substituted imidazoles with phenyl acetates in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v.80, n.1, p.148. 1958.
42. KOMIYAMA, M.; BENDER, M. L.; UTAKA, M.; TAKEDA, A. Model for "charge-relay": Acceleration by carboxylate anion in intramolecular general base-catalyzed ester hydrolysis by the imidazolyl group. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.7, p.2634. 1977.
43. MALLICK, I. M.; D'SOUZA, V. T.; YAMAGUCHI, M.; LEE, J.; CHALABI, P.; GADWOOD, R. C.; BENDER, M. L. An organic chemical model of the acyl- α -chymotrypsin intermediate. **Journal of the American Chemical Society**, v.106, n.23, p.7252. 1984.
44. BOWDEN, K.; BROWNHILL, A. Intramolecular catalysis. Part 9.1 The hydrolysis of p-nitrophenyl acetate catalysed by imidazoles having proximate carboxylate groups. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n.2, p.219. 1997.

45. LECLAIRE, J.; MAZARI, M.; ZHANG, Y.; BONDUELLE, C.; THILLAYE DU BOULLAY, O.; MARTIN-VACA, B.; BOURISSOU, D.; DE RIGGI, I.; FORTRIE, R.; FOTIADU, F. Bare Histidine–Serine Models: Implication and Impact of Hydrogen Bonding on Nucleophilicity. **Chemistry: A European Journal**, v.19, n.34, p.11301. 2013.
46. SKOREY, K.; SOMAYAJI, V.; BROWN, R. Direct O-acylation of small molecules containing CO₂---HN. rarw. HO units by a distorted amide: enhancement of amine basicity by a pendant carboxylate in a serine protease mimic. **Journal of the American Chemical Society**, v.111, n.4, p.1445. 1989.
47. WOLFENDEN, R.; RIDGWAY, C.; YOUNG, G. Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v.120, n.4, p.833. 1998.
48. NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan. 2008. p.
49. NEIDLE, S. **Principles of nucleic acid structure**. Academic Press. 2010. p.
50. KAMERLIN, S. C.; SHARMA, P. K.; PRASAD, R. B.; WARSHEL, A. Why nature really chose phosphate. **Quarterly Reviews of Biophysics** v.46, n.1, p.1. 2013.
51. MATTHEWS, H. R. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Pharmacology & Therapeutics**, v.67, n.3, p.323. 1995.
52. WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**, v.235, n.4793, p.1173. 1987.
53. KARALLIEDDE, L.; SENANAYAKE, N. Organophosphorus insecticide poisoning. **British Journal of Anaesthesia**, v.63, n.6, p.736. 1989.
54. GUPTA, R. C. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: Burlington, 2006, p 3.
55. ANVISA, P. D. A. D. R. D. A. E. A. P.-R. D. A. D. E.; ANVISA: Brasília, 2013.

56. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v.26, n.5, p.745. 2003.
57. DOMINGOS J. B., L. E., MACHADO V. G. E NOME F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v.26, n.5, p.8. 2003.
58. MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of phosphate esters by hydroxyl-functionalized micellar and vesicular reagents. **Journal of Organic Chemistry**, v.48, n.4, p.588. 1983.
59. WANDERLIND, E. H.; ORTH, E. S.; MEDEIROS, M.; SANTOS, D. M. P. O.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; FIEDLER, H. D.; NOME, F. Aqueous Micelles as Catalytic Nanoreactors for Dephosphorylation Reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, p.2385. 2014.
60. BRESLOW, R.; SINGH, S. Phosphate ester cleavage catalyzed by bifunctional zinc complexes: Comments on the "p-nitrophenyl ester syndrome". **Bioorganic Chemistry**, v.16, n.4, p.408. 1988.
61. CHIN, J.; ZOU, X. Catalytic hydrolysis of cAMP. **Canadian Journal of Chemistry**, v.65, n.8, p.1882. 1987.
62. STELTER, L.; VON SONNTAG, C.; SCHULTE-FROHLINDE, D. Phosphate Ester Cleavage in Ribose-5-phosphate Induced by OH Radicals in Deoxygenated Aqueous Solution. **International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine**, v.29, n.3, p.255. 1976.
63. ORTH, E. S.; BRANDÃO, T. A. S.; MILAGRE; EBERLIN, M. N.; NOME, F. Intramolecular Acid-Base Catalysis of a Phosphate Diester: Modeling the Ribonuclease Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.8, p.2436. 2008.
64. BRANDÃO, T. A. S.; ORTH, E. S.; ROCHA, W. R.; BORTOLUZZI, A. J.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Intramolecular General Acid Catalysis of the Hydrolysis of 2-(2'-Imidazolium)phenyl Phosphate, and Bond Length-Reactivity Correlations for Reactions of Phosphate Monoester Monoanions. **Journal of Organic Chemistry**, v.72, n.10, p.3800. 2007.
65. ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A.; SOUZA, B. S.; PLIEGO, J. R.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Intramolecular catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.24, p.8513. 2010.

66. KIRBY, A. J.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; ORTH, E. S.; BRANDAO, T. A. S.; WANDERLIND, E. H.; AMER, A.; WILLIAMS, N. H.; NOME, F. Activating Water: Important Effects of Non-leaving Groups on the Hydrolysis of Phosphate Triesters. **Chemistry: A European Journal**, v.17, n.52, p.14996. 2011.
67. KIRBY, A. J.; SOUZA, B. S.; NOME, F. Structure and reactivity of phosphate diesters. Dependence on the nonleaving group. **Canadian Journal of Chemistry**, v.93, n.4, p.422. 2015.
68. BURDEINYI, M.; POPKOV, S.; KHARCHEVNIKOVA, M. Synthesis of azolyethyl benzhydryl ethers, analogs of diphenhydramine. **Russian Chemical Bulletin**, v.58, n.5, p.936. 2009.
69. MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and Use of Stability Constants**. Wiley. 1992. p.
70. FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. Temperature Dependence of Deltapd Correction for Use of Glass Electrode in D2O. **J Phys Chem-Us**, v.65, n.6, p.1079. 1961.
71. YOSHIDA, K.; KURONO, Y.; MORI, Y.; IKEDA, K. E. N. Esterase-like Activity of Human Serum Albumin. V. Reaction with 2, 4-Dinitrophenyl Diethyl Phosphate. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.33, n.11, p.4995. 1985.
72. PANDEY, J.; TIWARI, V. K.; VERMA, S. S.; CHATURVEDI, V.; BHATNAGAR, S.; SINHA, S.; GAIKWAD, A. N.; TRIPATHI, R. P. Synthesis and antitubercular screening of imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.8, p.3350. 2009.
73. MEDEIROS, M.; ORTH, E. S.; MANFREDI, A. M.; PAVEZ, P.; MICKE, G. A.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Dephosphorylation Reactions of Mono-, Di-, and Triesters of 2,4-Dinitrophenyl Phosphate with Deferoxamine and Benzohydroxamic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v.77, n.23, p.10907. 2012.
74. LEE, J.; KIM, J.; KOH, J. S.; CHUNG, H.-H.; KIM, K.-H. Hydantoin derivatives as non-peptidic inhibitors of Ras farnesyl transferase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, n.7, p.1954. 2006.
75. ICHIKAWA, T.; WAKO, T.; NEMOTO, N. Synthesis of polysiloxane-based quaternized imidazolium salts with a hydroxy group at the end of alkyl groups. **Reactive and Functional Polymers**, v.99, p.1. 2016.
76. RAMASAMY, R. Vibrational spectroscopic studies of imidazole. **Armenian Journal of Physics**, v.8, n.1, p.51. 2015.

77. ECKERT, F.; LEITO, I.; KALJURAND, I.; KÜTT, A.; KLAMT, A.; DIEDENHOFEN, M. Prediction of acidity in acetonitrile solution with COSMO-RS. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, n.5, p.799. 2009.
78. KÜTT, A.; LEITO, I.; KALJURAND, I.; SOOVÄLI, L.; VLASOV, V. M.; YAGUPOLSKII, L. M.; KOPPEL, I. A. A Comprehensive Self-Consistent Spectrophotometric Acidity Scale of Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, n.7, p.2829. 2006.
79. MATUSZAK, C.; MATUSZAK, A. Imidazole-Versatile today, prominent tomorrow. **Journal of Chemical Education**, v.53, n.5, p.280. 1976.
80. KATRITZKY, A. R.; REES, C. W. **Comprehensive heterocyclic chemistry: the structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds**. Pergamon Press. 1984. p.
81. ORTH, E. S. **REAÇÕES NUCLEOFÍLICAS DE DESFOSFORILAÇÃO COM IMIDAZOL E HIDROXAMATO: MODELAGEM EM SISTEMAS INTRA- E INTERMOLECULAR, POLIMÉRICO E MICELAR**. Departamento de Química, UFSC, Florianópolis, 2011. p.
82. MASKILL, H. **Structure and Reactivity in Organic Chemistry**. OUP Oxford. 1999. p.
83. ORTH, E. S.; WANDERLIND, E. H.; MEDEIROS, M.; OLIVEIRA, P. S. M.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; KIRBY, A. J.; NOME, F. Phosphorylimidazole Derivatives: Potentially Biosignaling Molecules. **Journal of Organic Chemistry**, v.76, n.19, p.8003. 2011.
84. CAMPOS, R. B.; MENEZES, L. R. A.; BARISON, A.; TANTILLO, D. J.; ORTH, E. S. The Importance of Methyl Positioning and Tautomeric Equilibria for Imidazole Nucleophilicity. **Chemistry: A European Journal**, v.22, n.43, p.15521. 2016.
85. KIRBY, A. J.; DAVIES, J. E.; BRANDÃO, T. A.; DA SILVA, P. F.; ROCHA, W. R.; NOME, F. Hydroxylamine as an oxygen nucleophile. Structure and reactivity of ammonia oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.38, p.12374. 2006.
86. GORENSTEIN, D. G. **Phosphorous-31 NMR: Principles and applications**. Academic Press. 2012. p.

87. HENGGE, A. C.; ONYIDO, I. Physical organic perspectives on phospho group transfer from phosphates and phosphinates. **Current Organic Chemistry**, v.9, n.1, p.61. 2005.
88. CASTRO, E. A.; UGARTE, D.; ROJAS, M. F.; PAVEZ, P.; SANTOS, J. G. Nucleophilic substitution reactions of diethyl 4-nitrophenyl phosphate triester: Kinetics and mechanism. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.43, n.12, p.708. 2011.

APÊNDICE A – DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES

Dedução da equação 2

Para a determinação das constantes k_{obs} com o organofosforado DEDNPP foi utilizada a equação típica de primeira ordem, sendo monitorada a formação do produto 2,4 dinitrofenolato.

$$\frac{d[DNF]}{dt} = k_{obs}[DEDNPP] \quad (A1)$$

$$\frac{d[DEDNPP]}{dt} = -k_{obs}[DEDNPP] \quad (A2)$$

$$\int_{[DEDNPP]_0}^{[DEDNPP]} \frac{1}{[DEDNPP]} d[DEDNPP] = - \int_0^t k_{obs} dt \quad (A3)$$

$$\ln \left(\frac{[DEDNPP]}{[DEDNPP]_0} \right) = -k_{obs}t \quad (A4)$$

$$[DEDNPP] = [DEDNPP]_0 e^{-k_{obs}t} \quad (A5)$$

$$\frac{d[DNF]}{dt} = k_{obs}[DEDNPP]_0 e^{-k_{obs}t} \quad (A6)$$

$$\int_0^t d[DNF] = k_{obs}[DEDNPP]_0 \int_0^t e^{-k_{obs}t} dt \quad (A7)$$

$$[DNF] = k_{obs}[DEDNPP]_0 \left(\frac{e^{-k_{obs}t} - 1}{-k_{obs}} \right) \quad (A8)$$

$$[DNF] = -[DEDNPP]_0 (e^{-k_{obs}t} - 1) \quad (A9)$$

A partir da estequiometria sabemos que a concentração inicial do organofosforado é igual a concentração do produto DNF ao final da reação, assim podemos substituir o termo $[DEDNPP]_0 = [DNF]_F$.

$$[DNF] = -[DNF]_F (e^{-k_{obs}t} - 1) \quad (A10)$$

Combinando a equação A10 com a lei de Lambert-Beer (A11) substituímos a concentração do produto [DNF] diretamente pela absorbância e aplicamos o fator de correção para descontar a absorbância inicial chegando na equação utilizada (12A).

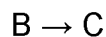
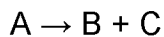
$$A = C\varepsilon\ell \quad (A11)$$

Onde A = absorbância, C = concentração, ε = absorvidade molar e ℓ = caminho ótico.

$$[A_{DNF}] = -([A_{DNF}]_F - [A_0])(e^{-k_{obs}t} - 1) + [A_0] \quad (A12)$$

Dedução da equação 12

A reação com o organofosforado BDNPP segue uma cinética de reações consecutivas, em condições de pseudo primeira ordem, podemos utilizar o modelo reacional a seguir:



Assim, as equações integradas têm a seguinte forma:

$$\frac{dA}{dt} = -k_1[A] \quad (A13)$$

$$\frac{dA}{[A]} = -k_1 dt \quad (A14)$$

$$\int_{[A_i]}^{[A]} \frac{1}{[A]} da = -k_1 \int_0^t dt \quad (A15)$$

$$\ln \frac{[A]}{[A_i]} = -k_1 t \quad (A16)$$

$$[A] = [A_i]e^{-k_1 t} \quad (A17)$$

Para o intermediário [B]:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad (A18)$$

$$\frac{d[B]}{dt} + k_2[B] = k_1[A_i]e^{-k_1 t} \quad (A19)$$

Usando fator integrante:

$$f(t) = e^{k_2 t} \text{ (Multiplicando todos os termos)}$$

$$e^{k_2 t} \frac{d[B]}{dt} + e^{k_2 t} k_2[B] = e^{k_2 t} k_1[A_i] * e^{-k_1 t} \quad (A20)$$

$$\frac{d[B]e^{k_2 t}}{dt} = e^{k_2 t} k_1[A_i]e^{-k_1 t} \quad (A21)$$

$$\int_0^{[B]e^{k_2 t}} d[B]e^{k_2 t} = \int_0^t k_1[A_i]e^{t(k_2-k_1)} dt \quad (A22)$$

$$[B]e^{k_2 t} = k_1[A_i] \left(\frac{e^{t(k_2-k_1)} - 1}{k_2 - k_1} \right) \quad (A23)$$

$$[B] = \frac{k_1[A_i]}{k_2 - k_1} (e^{-tk_1} - e^{-tk_2}) \quad (A24)$$

Para o produto [C]:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1[A] + k_2[B] \quad (A25)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1[A_i] * e^{-k_1 t} + k_2 \frac{k_1[A_i]}{k_2 - k_1} \quad (A26)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1[A_i] \left(\frac{k_2 e^{-tk_1} - k_2 e^{-tk_2}}{k_2 - k_1} + e^{-tk_1} \right) \quad (A27)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1 [A_i] \left(\frac{2k_2 e^{-tk_1} - k_2 e^{-tk_2} - k_1 e^{-tk_1}}{k_2 - k_1} \right) \quad (A28)$$

$$\int_0^t d[C] = \int_0^t k_1 [A_i] \left(\frac{2k_2 e^{-tk_1} - k_2 e^{-tk_2} - k_1 e^{-tk_1}}{k_2 - k_1} \right) dt \quad (A29)$$

$$[C] = k_1 [A_i] \left(\frac{2k_2 e^{-tk_1} - 2k_2}{k_2^2 - k_1 k_2} + \frac{k_2 - k_2 e^{-tk_2}}{-k_2^2 + k_1 k_2} + \frac{k_1 - k_1 e^{-tk_1}}{k_1^2 - k_1 k_2} \right) \quad (A30)$$

Utilizando a estequiometria da reação para a conversão da concentração de reagente em produto e a lei de Lambert-Beer (A11) para deixa-la em função da absorbância obtemos a forma final da equação (A34).

$$[A_i] = \frac{[C_\infty]}{2} \quad (A31)$$

$$[C] = \frac{Abs_{[C]}}{El} \quad (A32)$$

Substituindo A31 e A32 em A30:

$$\frac{Abs_{[C]}}{El} = k_1 \frac{Abs_{[C]_\infty}}{2El} \left(\frac{2k_2 e^{-tk_1} - 2k_2}{k_2^2 - k_1 k_2} + \frac{k_2 - k_2 e^{-tk_2}}{-k_2^2 + k_1 k_2} + \frac{k_1 - k_1 e^{-tk_1}}{k_1^2 - k_1 k_2} \right) \quad (A33)$$

Adicionando o fator de correção para absorbância caso a absorbância inicial seja diferente de zero. Assim temos a lei de velocidade integrada para o produto da reação em função da absorbância, sendo essa utilizada nos ajustes cinéticos (A34).

$$Abs_{[C]} = k_1 \frac{Abs_{[C]_\infty} - A_0}{2} \left(\frac{2k_2 e^{-tk_1} - 2k_2}{k_2^2 - k_1 k_2} + \frac{k_2 - k_2 e^{-tk_2}}{-k_2^2 + k_1 k_2} + \frac{k_1 - k_1 e^{-tk_1}}{k_1^2 - k_1 k_2} \right) + A_0 \quad (A34)$$

Onde: $Abs_{[C]}$ = absorbância do produto em determinado tempo, $Abs_{[C]_\infty}$ = absorbância em tempo infinito, k_1 = constante de velocidade da primeira etapa, k_2 = constante de velocidade da segunda etapa, t = tempo e A_0 = absorbância inicial.

Dedução da equação 5

A lei de velocidade para a reação entre os derivados de IMZ e o respectivo organofosforado devem incluir as diversas reações que ocorrem paralelamente. A hidrólise espontânea, a hidrólise alcalina e a reação catalisada pelo derivado de imidazol (equação A35). Dessa forma temos:

$$\frac{d[OP]}{dt} = -k_1 [H_2O][OP] - k_{OH} [^-OH][OP] - k_N [DIMZ][OP] \quad (A35)$$

$$\frac{d[OP]}{dt} = -[OP](k_1 [H_2O] + k_{OH} [^-OH] + k_N [DIMZ]) \quad (A36)$$

As reações ocorreram em condições de pseudo-primeira ordem, assim a concentração dos respectivos nucleófilos virtualmente não varia durante a reação. Então a equação A36 reduz-se a equação A37:

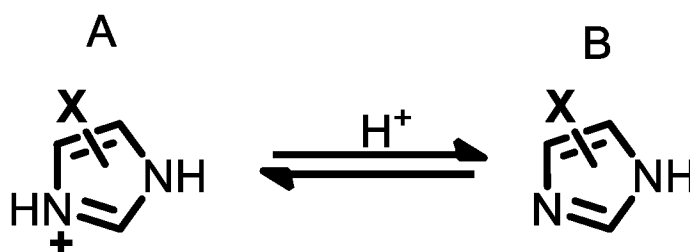
$$\frac{d[OP]}{dt} = -k_{obs}[OP] \quad (A37)$$

Onde:

$$k_{obs} = k_1[H_2O] + k_{OH}[^-OH] + k_N[DIMZ] \quad (A38)$$

A reação entre a água e o organofosforado trata-se de uma solvólise, sendo assim o produto $k_1[H_2O]$ é constante, sendo doravante denominado k_o . O perfil reacional de $k_{obs} \times pH$ foi ajustado de acordo com a equação A38, entretanto, apenas o derivado de IMZ em sua forma neutra apresenta reatividade e a concentração de íons hidroxila varia de acordo com as condições de pH estudadas. Dessa forma devemos considerar essas variações na equação utilizada. Então, a partir do equilíbrio ácido-base e do balanço de massa obtemos a expressão da fração molar da espécie reativa:

ESQUEMA A1 - EQUÍLIBRIO ÁCIDO-BASE DOS DERIVADOS DE IMZ



$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[A]} \quad (A39)$$

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{K_a}{[H^+]} \quad (A40)$$

$$[1HEZ] = [A] + [B] \quad (A41)$$

$$\frac{[1HEZ]}{[B]} = \frac{[A]}{[B]} + 1 \quad (A42)$$

$$f_{molar [B]}^{-1} = \frac{[H^+]}{K_a} + 1 \quad (A43)$$

$$f_{molar [B]} = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (A44)$$

A concentração de hidroxila pode ser calculada em função do pH da solução.

$$pH = -\log[H^+] \quad (A45)$$

$$10^{-pH} = [H^+] \quad (A46)$$

$$pOH = -\log[OH^-] \quad (A47)$$

$$10^{-pOH} = [OH^-] \quad (A48)$$

$$pH + pOH = 14 \quad (A49)$$

$$10^{pH-14} = [OH^-] \quad (A50)$$

Combinando as equações A38, A44 e A50 obtemos a forma final da equação utilizada nos ajustes.

$$k_{obs} = k_0 + k_{OH}10^{pH-14} + k_N \left(\frac{K_a}{K_a + [10^{-pH}]} \right) [DMIZ] \quad (A51)$$

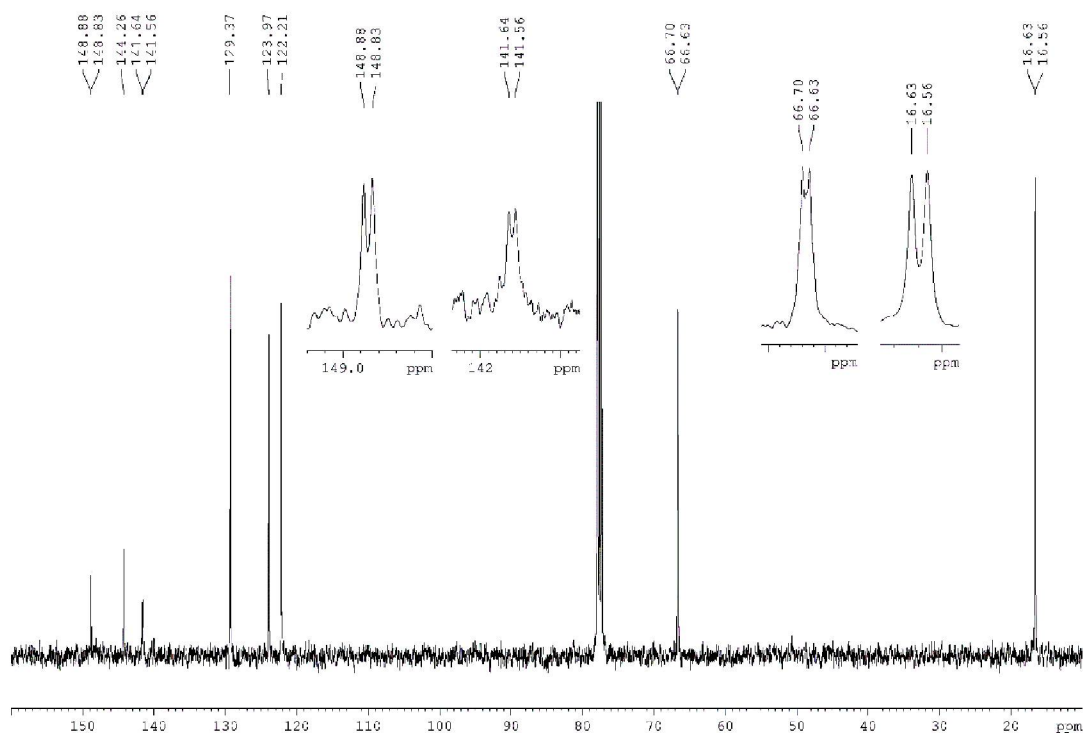
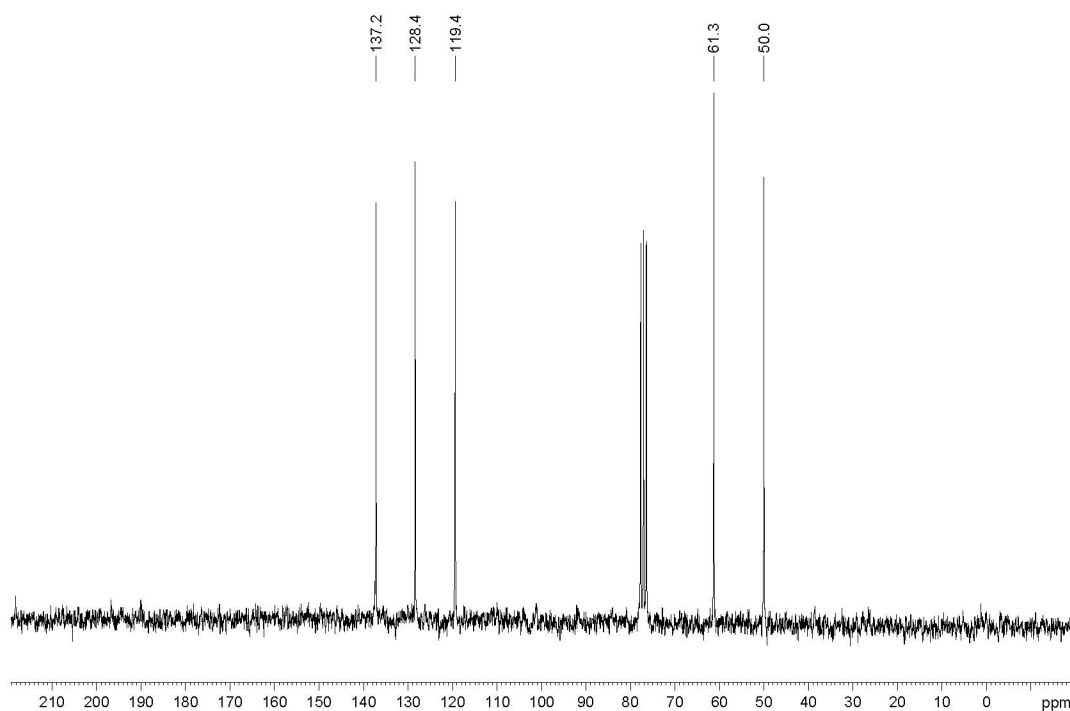
APÊNDICE B – DADOS EXPERIMENTAIS COMPLEMENTARESFigura A1 - RMN de ^{13}C do DEDNPP, 50MHz, CDCl_3 Figura A 2 - RMN de ^{13}C do 1-HEZ 50MHz, CDCl_3 

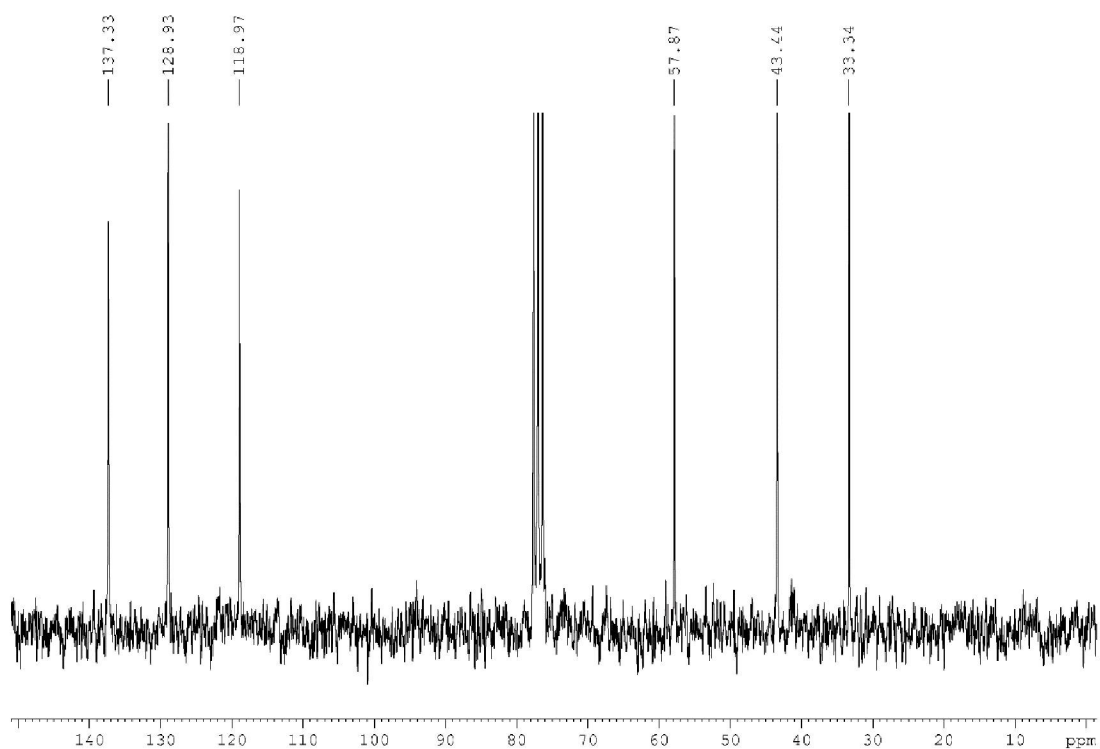
Figura A3 - RMN de ^1H do 1-HPZ 200 MHz, CDCl_3 , TMS

Figura A4 - Curva de transmitância versus temperatura e 1ª derivada da curva para determinação do ponto de fusão do 1-HEZ

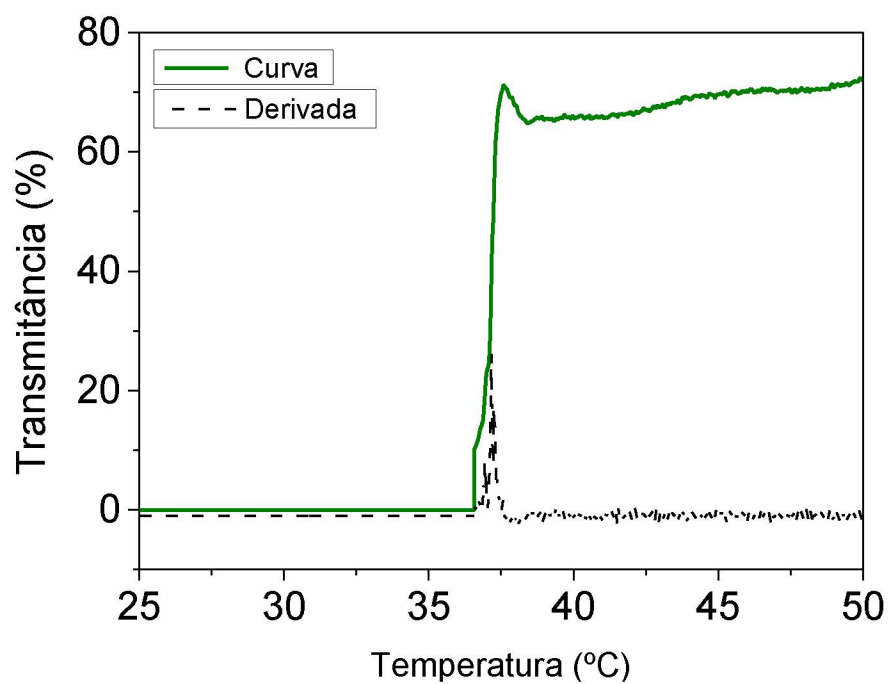


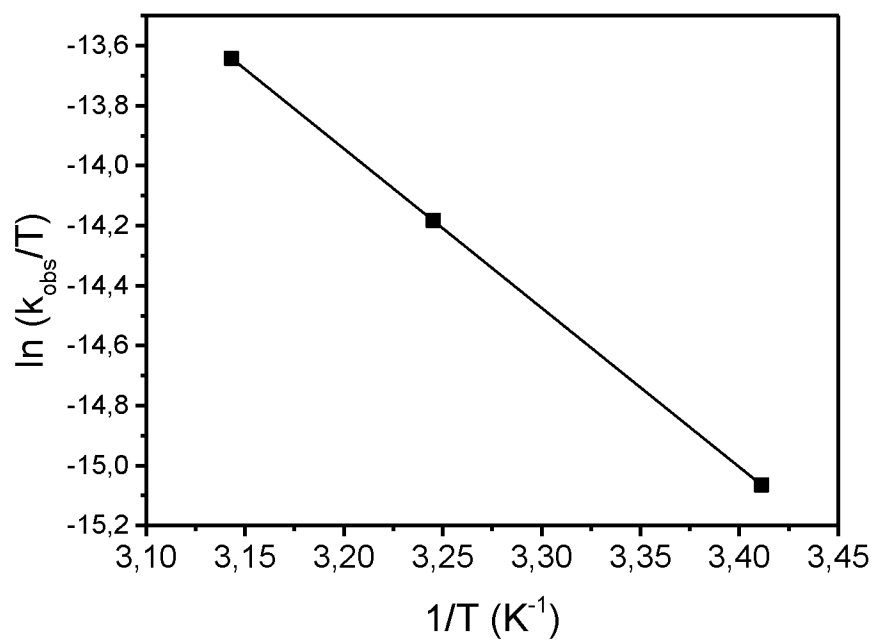
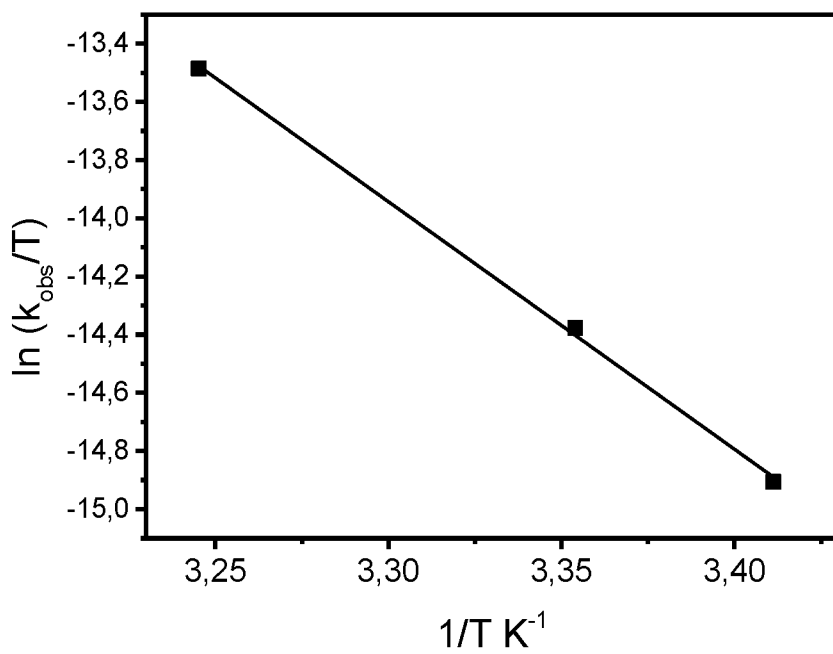
Figura A 5 - Perfil de temperatura para reação do 1-HPZ com BDNPP (0,1 mol. L⁻¹)Figura A 6 - - Perfil de temperatura para reação do 1-HEZ com BDNPP (0,1 mol. L⁻¹)

Figura A 7 - Perfil de temperatura para reação do 4(5) HMZ com BDNPP (0,3 mol. L⁻¹)

